

**Charakterisierung der transkriptionellen Aktivierung des  
*cadBA*-Operons durch den Transmembranregulator  
CadC aus *Escherichia coli***

**Dissertation**

zum Erwerb des Doktorgrades der Biologie  
an der Biologischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

von

**Christoph Küper**

München, im November 2005



**Ludwig-Maximilians-Universität München**

1. Gutachter

**Professor Dr. Kirsten Jung**  
Department Biologie I, Bereich Mikrobiologie  
Ludwig-Maximilians-Universität  
München

2. Gutachter

**Professor Dr. Martin Parniske**  
Department Biologie I, Bereich Genetik  
Ludwig-Maximilians-Universität  
München

**Tag der mündlichen Prüfung:  
13. Januar 2006**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>13</b>
2.1 Materialien.....	13
2.2 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide.....	14
2.3 Anzuchtverfahren.....	20
2.3.1 Induktion und Aktivität des Cad-Systems.....	20
2.3.2 Phänotypische Charakterisierung einer <i>cadC</i> -Mutante.....	20
2.3.3 <i>In vivo</i> analyse der <i>cadBA</i> -Promotorregion.....	21
2.3.4 Nachweis der N-terminalen Domäne von CadC.....	22
2.3.5 Lokalisation und Funktionalität verkürzter CadC-Derivate.....	22
2.3.6 <i>In vivo</i> Oligomerisierung.....	23
2.4 Molekularbiologische und Genetische Methoden.....	23
2.4.1 Plasmidisolierung.....	23
2.4.2 Isolierung genomischer DNA.....	23
2.4.3 Modifikation von DNA.....	23
2.4.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA.....	24
2.4.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	24
2.4.6 DNA-Sequenzanalyse.....	24
2.4.7 Präparation kompetente Zellen und Transformation.....	25
2.4.8 Isolierung von RNA.....	25
2.4.9 Northern-Hybridisierungen.....	26
2.4.10 Markierung von DNA.....	26
2.4.11 P1-Phagenlysatpräparation und P1-Transduktion.....	27
2.4.12 Plasmidkonstruktion.....	27
2.4.13 Stammkonstruktion.....	29
2.4.14 Bestimmung der Lebendzellzahl.....	31
2.5 Biochemische und Analytische Methoden.....	31
2.5.1 Reinigung und Rekonstitution von His <sub>10</sub> -CadC und His <sub>10</sub> -CadC 1-215.....	31
2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	32
2.5.3 Proteinbestimmung.....	33
2.5.4 Immunoblot.....	33
2.5.5 DNaseI-Schutzexperimente.....	34
2.5.6 DNA-Bindeexperimente.....	34
2.5.7 Lokalisationsstudien.....	35
2.5.8 $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsbestimmung.....	36
2.5.9 Lysindecaboxylase-Aktivitätsbestimmung.....	37
2.5.10 Bestimmung der extrazellulären Lysin- und Cadaverin-Konzentration.....	38
2.5.11 Quervernetzungsstudien.....	39
2.5.12 Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen His <sub>10</sub> -CadC.....	39
2.6 Biophysikalische Methoden.....	40
2.6.1 MALDI-TOF-Massenspektroskopie.....	40
2.7 Mathematisches Modell des Cad-Systems.....	40

<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>41</b>
3.1 Charakterisierung der Bindung von CadC an den P <sub>Cad</sub> -Promotor.....	41
3.1.1 DNaseI-Schutzexperimente.....	41
3.1.2 DNA-Bindeexperimente <i>in vitro</i> .....	42
3.1.3 Bedeutung der CadC-Bindestellen <i>in vivo</i> .....	43
3.2 Repression des <i>cadBA</i> -Operons unter nicht-induzierenden Bedingungen.....	46
3.2.1 Deletionsanalysen der regulatorischen Region des <i>cadBA</i> -Operons.....	46
3.2.2 Computer-gestützte Analyse der <i>cadBA</i> -Promotorregion.....	50
3.2.3 Notwendigkeit von CadC für die <i>cadBA</i> -Expression.....	50
3.3 Untersuchungen zum Aktivierungsmechanismus von CadC.....	52
3.3.1 Das Oligomerisierungsmodell.....	52
3.3.1.1 Quervernetzungsstudien <i>in vitro</i> .....	53
3.3.1.2 <i>In vivo</i> Versuche zur Oligomerisierung.....	55
3.3.2 Das Proteolysemodell.....	59
3.3.2.1 Massenspektrometrische Analyse des Peptids.....	60
3.3.2.2 Nachweis der N-terminalen Domäne im Zytoplasma.....	62
3.3.2.3 Funktionalität C-terminal verkürzter CadC-Peptide.....	66
3.4 Modellierung des Cad-Systems.....	70
3.4.1 Transkription des <i>cadBA</i> -Operons.....	70
3.4.2 Expression von <i>cadA</i> .....	72
3.4.3 Extrazelluläre Konzentration von Lysin und Cadaverin.....	73
3.4.4 pH-Wert des Mediums.....	75
3.4.5 Gesamtzellzahl und Lebendzellzahl der Kultur <i>in vivo</i> .....	76
3.4.6 Untersuchungen zur Inhibition der <i>cadBA</i> -Transkription unter induzierenden Bedingungen.....	77
3.5 Untersuchungen zur Funktion des Cad-Systems.....	78
3.5.1 Funktion des Cad-Systems bei gemäßigttem Säurestress.....	78
3.5.2 Funktion des Cad-Systems bei extremen Säurestress.....	79
3.5.2.1 Überlebensrate von MG1655 und MG1655- $\Delta$ <i>cadC</i> bei extremen Säurestress... ..	79
3.5.2.2 Einfluss von Cadaverin auf die Überlebensrate bei extremen Säurestress.....	81
3.5.2.3 Wirkungsweise von Cadaverin bei extremen Säurestress.....	82
3.5.3 Induktion des Cad-Systems bei Zellen der stationären Phase.....	83
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>84</b>
4.1 Bindung von CadC an den P <sub>Cad</sub> -Promotor.....	84
4.1.1 Identifizierung der CadC-Bindestellen.....	84
4.1.2 Bindung von CadC an die Bindestellen <i>in vitro</i> .....	84
4.1.3 Einfluss der Bindestellen <i>in vivo</i> .....	86
4.2 Repression der <i>cadBA</i> -Expression unter nicht-induzierenden Bedingungen.....	87
4.3 Untersuchungen zur Aktivierung von CadC unter induzierenden Bedingungen.....	90
4.3.1 Oligomerisierung von CadC.....	90
4.3.2 Untersuchungen zur proteolytischen Prozessierung von CadC.....	92
4.4 Modellierung des Cad-Systems.....	97
4.5 Modell der transkriptionellen Aktivierung des <i>cadBA</i> -Operons durch CadC.....	101
4.6 Die Funktion des Cad-Systems in der Zelle.....	102
4.7 Ausblick.....	105
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>106</b>
<b>6. Literatur.....</b>	<b>108</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

AP	Alkalische Phosphatase
Ap <sup>R</sup>	Plasmidvermittelte Ampicillin-Resistenz
As	Aminosäuren
bp	Basenpaare
BMH	Bis-maleimidohexan
BSA	Rinderserumalbumin
Cm <sup>R</sup>	Plasmidvermittelte Chloramphenicol-Resistenz
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
Hepes	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -(2-Ethansulfonsäure)
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HRP	Meerrettichperoxidase
HTH	Helix-Turn-Helix
IgG	Immunglobuline der Klasse G
Kan <sup>R</sup>	Plasmidvermittelte Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasenpaare
k <sub>D</sub>	Affinitäts-/Bindungskonstante
kDa	Kilodalton
K <sub>M</sub>	Michaelis-Konstante
LDAO	Lauryldimethylaminoxid
LZZ	Lebendzellzahl
NICD	„Notch Intracellular Domain“
MALDI-TOF-MS	„matrix-assisted laser desorption/ionisation“ „time of flight“ Massenspektrometrie
MES	2-( <i>N</i> -Morpholino)-ethansulfonat
MOPS	<i>N</i> -Morpholinopropansulfonat
Ni <sup>2+</sup> -NTA	Ni <sup>2+</sup> -Triazetonitril
oNPG	ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte der Wellenlänge x nm

PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PLP	Pyridoxalphosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Periplasma
RP	Regulierte Proteolyse
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)-phosphin
TG	Tris/HCl-Glycerol
TM	Transmembrandomäne
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
U	Unit
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
ZM	Zytoplasmamembran
ZP	Zytoplasma

## Nomenklatur

Genprodukte von *cadC* werden so beziffert, dass das erste Methionin im Wildtyp-Protein in der Aminosäuresequenz mit „1“ bezeichnet wird, unabhängig ob N-terminal entsprechende „Linker“ oder „Histidin-Tags“ vorausgehen.

## 1. Einleitung

### **pH-Regulation in *Escherichia coli***

Die Anpassung an Bedingungen eines niedrigen externen pH-Wertes ist eine essentielle Fähigkeit für Enterobakterien bei der Besiedlung ihres Wirtsorganismus. Enterobakterien sind während der Magenpassage einem extremen Säurestress bei pH-Werten  $<3$  ausgesetzt. Im Intestinaltrakt wiederum sind die Zellen mit hohen Konzentrationen an membrangängigen, organischen Fettsäuren, wie z. B. Essigsäure oder Propionsäure, konfrontiert. Das neutrophile Enterobakterium *Escherichia coli* hat verschiedene Strategien entwickelt, um sowohl gemäßigten Säurestress als auch extremen Säurestress in seiner natürlichen Umgebung tolerieren zu können.

Bereits bei gemäßigtem Säurestress bei pH-Werten von 5,5–6,5 ist die Aufnahme von undissoziierten organischen Fettsäuren über die Zytoplasmamembran in die Zelle in hohem Maße verstärkt. In der neutralen Umgebung des Zytoplasmas dissoziieren die Fettsäuren, was ein Absinken des zytoplasmatischen pH-Wertes zur Folge hat.

Unter diesen Bedingungen sorgen die Mechanismen der pH-Homöostase für eine schnelle Neutralisierung des internen pH-Wertes. Die pH-Homöostase in *E. coli* umfasst sowohl passive als auch aktive Mechanismen. Zu den passiven Mechanismen zählt die Impermeabilität der Zytoplasmamembran für  $H^+$ -Ionen oder die Pufferkapazität des Zytoplasmas, die in erster Linie auf die Aminosäureseitenketten der Proteine zurückzuführen ist.

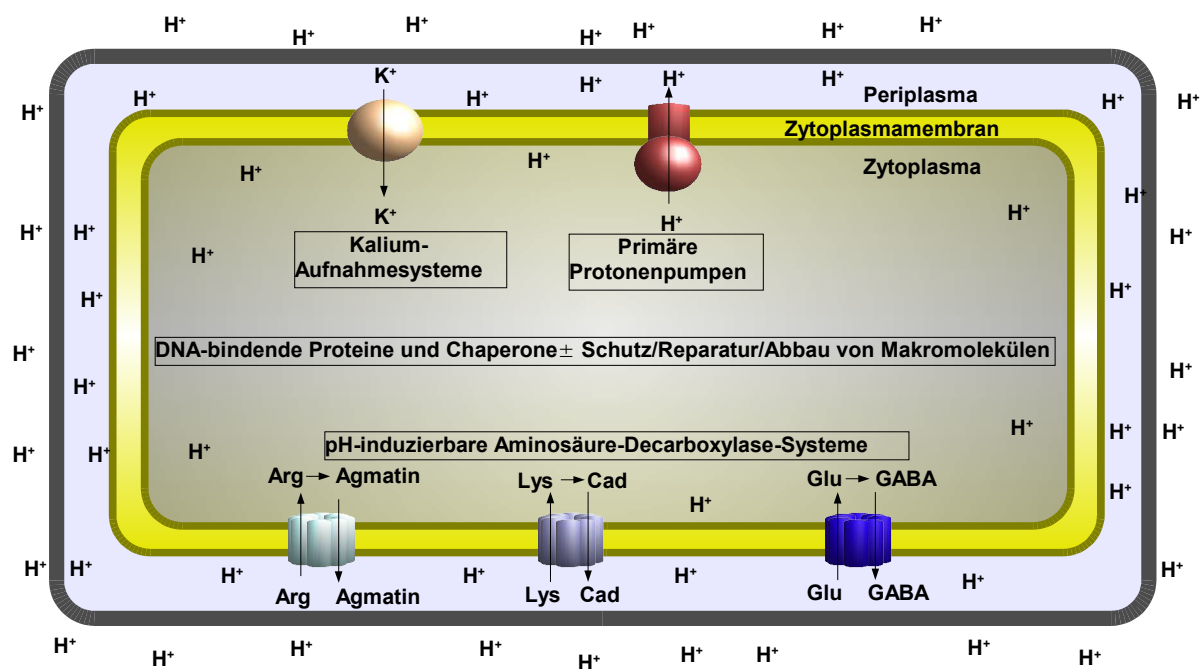
Bei der aktiven pH-Homöostase können Protonen durch die primären Protonenpumpen aus der Zelle transportiert werden. Da sich durch diese Ausschleusung ein immer größeres Membranpotential aufbaut, das einen weiteren Protonenexport verhindert, muss dieses Membranpotential durch den Transport von positiven Ladungen in die Zelle wieder verringert werden, wobei  $K^+$ -Transportsysteme wie TrkG, TrkH oder Kup involviert sind (Bakker und Mangerich, 1981; Dosch *et al.*, 1991; Rhoads *et al.*, 1976; White *et al.*, 1992; Abb. 1). Die Mechanismen der pH-Homöostase erlauben es *E. coli*, bei plötzlich wechselnden externen pH-Werten zwischen 5 und 9 den internen pH-Wert sehr schnell wieder auf 7,4–7,8 einzustellen. Diese schnelle Reaktion deutet daraufhin, dass die Komponenten der pH-Homöostase konstitutiv reguliert sind (Slonczewski *et al.*, 1982; Zilberstein *et al.*, 1984).

Vor allem während der Magenpassage ist *E. coli* mit externen pH-Werten  $<3$  konfrontiert. Selbst unter diesen Bedingungen kann *E. coli* eine Zeit lang überleben, ein Phänomen, das als Säureresistenz bezeichnet wird. Die konstitutiv exprimierten Systeme der pH-Homöostase können diese sehr niedrigen pH-Werte nicht mehr kompensieren. Die Grundlage der Säureresistenz in *E. coli* ist die Expression von zahlreichen verschiedenen Genen, die bei niedrigen pH-Werten induziert



werden. Daher ist für eine volle Ausprägung der Säureresistenz eine Adaption von *E. coli* bei niedrigen, aber nicht tödlichen pH-Werten von 5-6 notwendig (Goodson und Rowbury, 1989). Nach dieser Adaption kann *E. coli* unter Umständen mehrere Stunden einen pH-Wert von 1,5 überleben. Einige dieser Gene kodieren für DNA-bindende Proteine wie DPS oder für Chaperone wie HdeA oder HdeB (Gajiwala und Burley, 2000), die andere Makromoleküle vor den negativen Auswirkungen eines sauren pH-Wertes schützen können.

Insgesamt konnten 160 Gene identifiziert werden, die bei niedrigen pH-Werten verstärkt induziert werden (Maurer *et al.*, 2005), doch nur wenige konnten bisher charakterisiert werden. Zu den am längsten bekannten und best untersuchten pH-induzierten Systemen gehören die degradativen Aminosäure-Decarboxylase-Systeme. Diese Systeme katalysieren die Decarboxylierung der Aminosäuren Glutamat, Arginin und Lysin zu den entsprechenden Polyaminen und deren Exkretion ins Medium (Gale und Epps, 1942; Gale, 1946; Abb. 1). Allgemein wird eine Erhöhung des pH-Wertes des Mediums durch die basischen Polyamine angenommen. In einigen *E. coli*-Stämmen (allerdings nicht in K12-Stämmen, Applebaum *et al.*, 1977) existiert auch ein induzierbares Ornithin-Decarboxylase-System, doch scheint dieses für das Überleben der Zelle bei externen pH-Werten  $<3$  keine wichtige Rolle zu spielen.

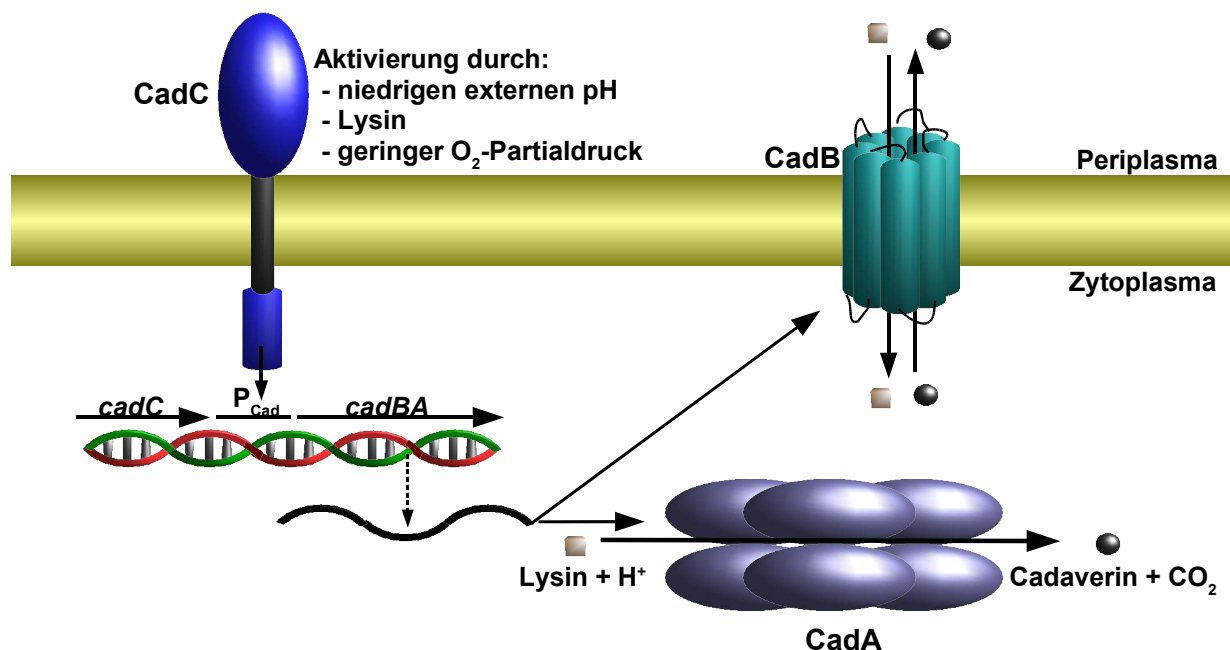


**Abb. 1: Mechanismen der Säureadaption in *E. coli***

Enterobakterien haben unterschiedliche Mechanismen der pH-Homöostase entwickelt. Passive Mechanismen sind die Impermeabilität der Zytoplasmamembran für Protonen und die Pufferkapazität des Zytoplasmas. Aktive pH-Homöostase wird durch Ausschleusung von  $H^+$ -Ionen durch Protonenpumpen realisiert, ein Vorgang, der vom gleichzeitigen Import von positiven Ladungen durch  $K^+$ -Aufnahmesysteme abhängig ist. Daneben werden verschiedene Proteine synthetisiert, die andere Makromoleküle schützen, reparieren oder notfalls abbauen. Einen Schutz bei externen pH-Werten  $<4,5$  bieten die induzierbaren Aminosäure-Decarboxylase-Systeme Gad, Adi und Cad.

Das Cad-System von *E. coli* besteht aus der zytoplasmatischen Lysin-Decarboxylase CadA (Sabo *et al.*, 1974), dem membranintegralen Lysin:Cadaverin-Antiporter CadB (Meng und Bennett, 1992a) und dem Regulator CadC (Abb. 2).

Das *cadBA*-Operon ist auf dem Chromosom bei 93,5 min lokalisiert und wird in *E. coli* bicistronisch abgelesen (Auger *et al.*, 1989). Das Operon liegt unter Kontrolle des  $P_{\text{Cad}}$ -Promotors. Der Transkriptionsaktivator ist das membranintegrale Protein CadC. Für die Bindung von CadC an die Promotorregion sind Bereiche zwischen bp -150 und -48 stromaufwärts des *cadBA*-Transkriptionsstarts wichtig (Meng und Bennett, 1992b). Das *cadC*-Gen liegt auf dem Chromosom von *E. coli* unmittelbar stromaufwärts des *cadBA*-Operons (Watson *et al.*, 1992). Die *cadBA*-Expression wird durch einen niedrigen externen pH-Wert und die Anwesenheit von Lysin ko-induziert. Unter anaeroben Bedingungen ist die Expression ca. 10-100 mal stärker als unter aeroben Bedingungen (Gale, 1942; Sabo *et al.*, 1974). Für die Expression des *cadBA*-Operons wird der  $\sigma^{70}$ -Faktor benötigt.



**Abb. 2: Das Cad-System vom *Escherichia coli***

Unter induzierenden Bedingungen (niedriger externer pH-Wert, Lysin, geringer  $O_2$ -Partialdruck) aktiviert der membrangebundene Transkriptionsregulator CadC die Transkription des *cadBA*-Operon. Die lösliche Lysin-Decarboxylase CadA decarboxyliert Lysin unter Verbrauch eines Protons zu Cadaverin und  $CO_2$ . Der Antiporter CadB schleust das produzierte Cadaverin aus dem Zytoplasma und transportiert gleichzeitig neues Lysin in die Zelle.

Bei CadA handelt es sich um eine Lysin-Decarboxylase, die Lysin unter Verbrauch eines Protons zu dem Polyamin Cadaverin und CO<sub>2</sub> decarboxyliert. Bereits 1974 konnte CadA gereinigt und charakterisiert werden (Sabo *et al.*, 1974). CadA hat eine relative Molekülmasse von ca. 82 kDa, und bildet in seiner aktiven Form vermutlich ein Dekamer.

Das entstehende Cadaverin wird durch den Lysin-Cadaverin-Antiporter CadB in das Periplasma geschleust, der im Gegenzug auch Lysin ins Zytoplasma befördert (Auger *et al.*, 1989). CadB ist vermutlich mit 12 Transmembrandomänen in der Zytoplasmamembran verankert und hat Ähnlichkeit mit dem Ornithin-Putrescin-Antiporter PotE (Meng und Bennett, 1992a; Soksawatmaekhin *et al.*, 2004). Das Protein hat eine relative Molekülmasse von etwa 47 kDa.

Das Gad-System besteht aus den Isozymen GadA und GadB (Smith *et al.*, 1992), die Glutamat zu  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) und CO<sub>2</sub> decarboxylieren, und dem Glutamat:GABA-Antiporter GadC (Hersh *et al.*, 1996). Die Regulation des Gad-Systems ist sehr komplex und beinhaltet u. a. die Regulatoren GadE, GadX und GadW. Bei Eintritt der Zelle in die stationäre Wachstumsphase wird es durch den Regulator GadX induziert (Ma *et al.*, 2002). Unter bestimmten Bedingungen kann das Gad-System auch in der logarithmischen Wachstumsphase bei niedrigem externen pH durch den Regulator GadE unter Kontrolle von  $\sigma^{70}$  aktiviert werden (Ma *et al.*, 2003).

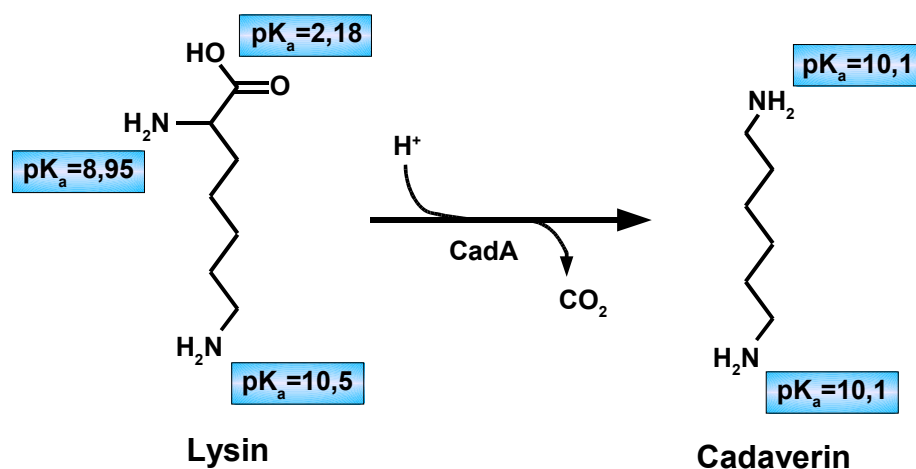
Das Adi-System besteht aus AdiA (Stim und Bennett, 1993), das die Decarboxylierung von Arginin zu Agmatin und CO<sub>2</sub> katalysiert, und dem Arginin:Agmatin-Antiporter AdiC (Iyer *et al.*, 2003; Gong *et al.*, 2003). Das Adi-System wird durch niedrigen externen pH, extrazelluläres Arginin und anaerobe Bedingungen ko-induziert. Die Regulation des Adi-Systems ist nicht genau geklärt. Sowohl GadE (Hommais *et al.*, 2004) als auch das Genprodukt des *adiY*-Locus (Stim-Herndon *et al.*, 1996) und CysB (Shi und Bennett, 1994) könnten eine regulatorische Funktion haben.

### **Physiologische Rolle des Cad-Systems**

Die genaue physiologische Rolle des Cad-Systems ist umstritten. Generell wird vermutet, dass die Produktion und Exkretion von Cadaverin und der Verbrauch eines Protons während der Decarboxylierungsreaktion (Abb. 3) den pH-Wert des Mediums erhöhen könnte.

Eine alternative physiologische Rolle des Cad-Systems könnte auch in der Bereitstellung von CO<sub>2</sub> unter anaeroben Bedingungen bestehen (Boeker und Snell, 1972). Die *cadBA*-Expression ist unter O<sub>2</sub>-limitierenden Bedingungen etwa 10-100 fach erhöht gegenüber aeroben Bedingungen. Im Experiment konnte die *cadBA*-Expression durch Zugabe von Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> bis zu einer Endkonzentration von 0.2 M um 50% reduziert werden. Des Weiteren war in *E. coli*-Zellen, die eine plasmidkodierte, CO<sub>2</sub>-produzierende Ornithindecarboxylase in großer Kopienzahl enthielten, die *cadBA*-Expression deutlich verringert (Takayama *et al.*, 1994). Diese Ergebnisse indizieren, dass die Aktivität von

CadC durch  $\text{CO}_2$  inhibiert wird. Experimente von Futatsugi *et al.* (1997) zeigten, dass *E. coli*-Zellen bei anaeroben Wachstum in saurem Medium durch die Zugabe von Lysin höhere Zelldichten erreichten, dies aber nicht mit einem sich erhöhenden pH-Wert des Mediums einher ging. Die Autoren schlossen aus diesen Ergebnissen ebenfalls, dass die physiologische Relevanz der Lysin-Decarboxylierung in erster Linie in der Bereitstellung von  $\text{CO}_2$  unter anaeroben Wachstumsbedingungen und weniger in der Neutralisierung des Mediums durch Cadaverin-Ausschleusung liegt.



**Abb. 3: Decarboxylierung von Lysin zu Cadaverin**

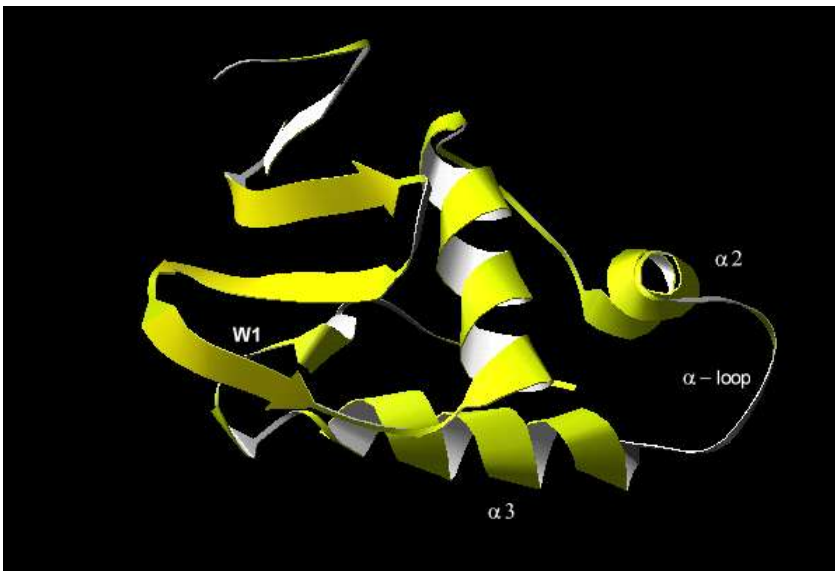
Durch das Cad-System wird Lysin aus dem Medium in die Zelle transportiert, unter Verbrauch eines Protons in Cadaverin umgewandelt und diese wieder ins Medium transportiert. Netto wird also  $\text{Lysin} + \text{H}^+$  zu  $\text{Cadaverin} + \text{CO}_2$  im Medium umgewandelt und der pH-Wert des Mediums dadurch erhöht. In der Abbildung sind Lysin und Cadaverin im nicht-ionisierten Zustand dargestellt, bei physiologischen pH-Werten liegt Lysin jedoch überwiegend einfach positiv und Cadaverin überwiegend zweifach positiv geladen vor.

Samartzidou und Delcour postulierten, dass eine weitere Funktion des Cad-Systems die Verringerung der Permeabilität der äußeren Membran unter sauren Bedingungen ist (Samartzidou und Delcour, 1999; Samartzidou *et al.*, 2003). Dies soll auf zwei Arten geschehen: zum einen blockiert das in das Periplasma ausgeschleuste Cadaverin die beiden Porine OmpC und OmpF. Zudem kann CadC möglicherweise an die Promotorregionen von *ompC* und *ompF* binden. Dies ergibt sich aus Sequenzvergleichen zwischen der *cadBA*-Promotorregion ( $P_{\text{Cad}}$ ) und Bereichen innerhalb der regulatorischen Regionen von *ompC* und *ompF*. Die Bindung von CadC innerhalb der regulatorischen Regionen würde dann eine verringerte Expression von *ompC* und *ompF* bewirken. Zusammen würden diese beiden Effekte eine um bis zu 30% verringerte Permeabilität der äußeren Membran bewirken.

### CadC und die Familie der ToxR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren

Der Regulator des *cadBA*-Operons CadC ist ein integrales Membranprotein, bestehend aus 512 Aminosäuren mit einer relativen Molekülmasse von ca. 58 kDa. Es enthält eine N-terminale zytoplasmatische Domäne (AS 1-158), eine Transmembrandomäne (AS 159-187) und eine C-terminale periplasmatische Domäne (AS 188-512) (Dell *et al.*, 1994).

Die N-terminale Domäne hat Ähnlichkeit mit den DNA-bindenden Domänen anderer Transkriptionsregulatoren (Watson *et al.*, 1992). Sequenzvergleiche mit den DNA-Bindedomänen verschiedener DNA-bindender Proteine ergaben, dass die Aminosäuren 2-103 ein so genanntes „winged Helix-Turn-Helix“-Motiv bilden (Abb. 4), wie es auch die Antwortregulatoren der RO<sub>II</sub>-Subgruppe (z. B. PhoB aus *E. coli*, VirG aus *Agrobacterium tumefaciens* oder OmpR aus *E. coli*)



**Abb. 4:** Die N-terminale DNA-bindende Domäne von CadC

Die Struktur wurde anhand der Aminosäuresequenz von CadC und nach Vorlage der 3D-Struktur der DNA-bindenden Domäne von PhoB aus *E. coli* computergestützt modelliert.

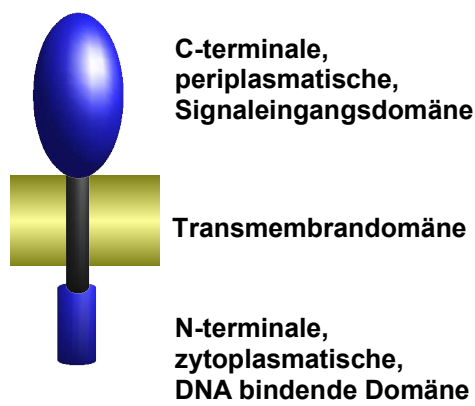
besitzen (Martinez-Hackert und Stock, 1997). Die Struktur dieses Bindemotivs konnte für den Regulator PhoB aus *E. coli* aufgeklärt werden: Das Helix-Turn-Helix-Motiv wird von den Helices  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$  und der dazwischenliegenden sog.  $\alpha$ -Schleife gebildet.  $\alpha 3$  ist die Erkennungshelix, die mit der großen Furche der DNA interagiert und dabei von  $\alpha 2$  stabilisiert wird. Die  $\alpha$ -Schleife interagiert mit der RNA-

Polymerase. Eine Schleife zwischen den zwei Faltblättern  $\beta 6$  und  $\beta 7$ , der sog. Flügel W1, interagiert mit der kleinen Furche der DNA (Blanco *et al.*, 2002).

Die C-terminale Domäne von CadC befindet sich im Periplasma. Die Signale, durch die die *cadBA*-Expression ko-induziert wird, sind ein saurer pH-Wert, Lysin und O<sub>2</sub>-Mangel. Dell *et al.* (1994) identifizierten CadC-Derivate mit einzelnen Aminosäureaustauschen in der C-terminalen Domäne, die in veränderten Sensoreigenschaften resultierten: CadC-Derivate mit Aminosäuresubstitutionen in der periplasmatischen Domäne zwischen As 260 und 270 konnten die *cadBA*-Expression unabhängig von Lysin aktivieren. CadC-Derivate mit Aminosäureaustauschen in der Nähe des C-Terminus aktivierten die *cadBA*-Expression unabhängig vom pH-Wert. Damit konsistent sind auch

Messungen, bei denen ein His-Tag am C-Terminus ebenfalls zu einer pH-unabhängigen *cadBA*-Expression führten (Küper, 2001). Die C-terminale Region der periplasmatischen Domäne scheint also essentiell für die pH-sensorischen Eigenschaften von CadC und somit die Signaleingangsdomäne zu sein. Dabei werden die Reize unabhängig voneinander registriert. Primer-Extension-Analysen zeigten, dass die Reihenfolge, in der die Reize registriert werden, für die CadC-Aktivierung vermutlich irrelevant ist (nicht-sequentielles Modell; Neely und Olson, 1996).

Aufgrund der Topologie wird CadC zu der so genannten Familie der ToxR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren gerechnet (Miller *et al.*, 1987). Neben CadC aus *E. coli* gehören zu dieser



**Abb. 5: Modularer Aufbau der membrangebundenen Mitglieder der ToxR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren**

Familie auch CadC-Proteine aus *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae* (Merrell und Camilli, 2000) und *Vibrio vulnificus* (Rhee *et al.*, 2002; Rhee *et al.*, 2005), das ToxR-Protein aus *V. cholerae* (und anderen *Vibrio*-Spezies) (Miller *et al.*, 1987), TcpP aus *V. cholerae* (Hase und Mekalanos, 1998), PsaE aus *Yersinia pseudotuberculosis* (Yang und Isberg, 1997) und WmpR aus *Pseudoalteromonas tunicata* (Egan *et al.*, 2002). Die Mitglieder dieser Familie zeichnen sich durch einen gemeinsamen modularen Aufbau aus: eine DNA-bindende N-terminale Domäne mit einem „winged Helix-Turn-Helix“-Motiv, eine einzelne Transmembrandomäne,

und eine C-terminale, periplasmatische Signaleingangsdomäne (Abb. 5). Wie CadC werden auch ToxR, TcpP und PsaE u. a. durch einen niedrigen externen pH-Wert aktiviert.

### Negative Regulation der *cadBA*-Expression

Im Wildtyp *E. coli* liegt die *cadBA*-Expression bei niedrigem pH-Wert in Abwesenheit von Lysin bei weniger als 1% im Vergleich zur vollen *cadBA*-Expression in Gegenwart von Lysin (Neely *et al.*, 1994). Popkin und Maas (1980) und Tabor *et al.* (1980) charakterisierten Mutanten von *E. coli*, die bei niedrigem externen pH auch in Abwesenheit von Lysin hohe Lysin-Decarboxylase-Aktivitäten aufwiesen. Die für diesen Phänotyp verantwortlichen Mutationen konnten im *lysP*-Locus (bei Tabor *et al.* als *cadR* bezeichnet) lokalisiert werden. *lysP* kodiert für die Lysin-Permease LysP, die mit 12 Transmembrandomänen in der Zytoplasmamembran verankert ist (Ellis *et al.*, 1995). Eine Überproduktion von Plasmid-kodiertem LysP führte zu einer Repression der *cadBA*-Expression auch unter induzierenden Bedingungen (Neely *et al.*, 1994). Eine Punktmutation in chromosomal kodiertem LysP resultierte ebenfalls in einer konstitutiven Repression der *cadBA*-

Expression (Neely und Olson, 1996). Wie die negative Regulation des *cadBA*-Operons in Abwesenheit von Lysin durch LysP genau vermittelt wird, ist nicht bekannt, aber es werden zwei Theorien postuliert: (i) in Abwesenheit von Lysin interagieren LysP und CadC, und CadC wird dabei in einer inaktiven Form fixiert. In Anwesenheit von Lysin transportiert LysP das Lysin und durch konformationelle Änderungen während des Transports wird CadC entlassen und kann (bei zusätzlichem niedrigem externen pH) in eine aktive Form wechseln. (ii) LysP besitzt eine höhere Affinität für Lysin als CadC. Lysin im periplasmatischen Raum wird durch LysP in das Zytoplasma transportiert, so dass die Lysin-Konzentration im Periplasma zu gering ist, um CadC durch Bindung an die C-terminale Domäne zu aktivieren. Erst bei höheren extrazellulären Lysin-Konzentrationen bleibt auch im Periplasma die Lysin-Konzentration hoch genug, um CadC bei niedrigem pH-Wert zu aktivieren (Neely *et al.*, 1994). Bislang konnte aber weder eine Interaktion von CadC und LysP nachgewiesen, noch die Affinitäten von LysP und CadC für Lysin bestimmt werden.

Bei neutralen externen pH-Werten ist die Expression des *cadBA*-Operons um mehr als das 100-fache reprimiert (Neely *et al.*, 1994). Shi *et al.* (1993) fanden eine deutlich erhöhte *cadBA*-Expression bei neutralen pH-Werten in *hns*-Deletionsstämmen. Das **H**iston-ähnliche **N**ukleoid **S**trukturierende Protein H-NS hat eine relative Molekülmasse von 15,4 kDa und liegt in etwa 15000-20000 Kopien pro Zelle vor (Dorman, 2004). H-NS ist ein globaler Repressor in Enterobakterien. In *E. coli* reprimiert es neben dem Cad-System u. a. auch die induzierbaren Aminosäure-Decarboxylase-Systeme Gad (Giangrossi *et al.* 2005) und Adi (Shi *et al.*, 1993) unter nicht-induzierenden Bedingungen. In *V. cholerae* werden u. a. die ToxR-regulierten Gene *toxT* und *ctx* durch H-NS reprimiert. H-NS bindet nicht an eine bestimmte Konsensussequenz auf der DNA, sondern bevorzugt an AT-reiche, intrinsisch gekrümmte DNA-Bereiche (Owen-Hughes *et al.*, 1992). Die Interaktion mit der DNA erfolgt mit der C-terminalen Domäne, während die N-terminale Domäne des Proteins für die Ausbildung von Homooligomeren wichtig ist. Diese Fähigkeit zur Oligomerisierung ist essentiell für die Funktion von H-NS (Dorman *et al.*, 2004).

Die molekularen Mechanismen der H-NS vermittelten Repression können variieren. Wenn die Bindestellen von H-NS innerhalb der -35/-10 Promotorregion eines Gens liegen, konkurriert H-NS mit der RNA-Polymerase um die Bindung an den Promotor und reprimiert dadurch die Transkription, dies ist z. B. der Fall bei der Repression des *rrnB*-Gens in *E. coli* (Tippner *et al.*, 1994). Ein anderer Mechanismus ist die Bindung von H-NS an DNA-Bereiche stromaufwärts oder stromabwärts von Promotorelementen, z. B. bei der Repression von *proU* aus *Salmonella enterica* (Owen-Hughes *et al.*, 1992). Durch diese Bindung könnten lokale Superspiralisierungen in der DNA induziert werden. Dadurch könnten Promotorelemente in einer Konformation fixiert werden, die eine Bindung der RNA-Polymerase erschweren (Owen-Hughes *et al.*, 1992).

Externes Cadaverin als Endprodukt der Lysindecaboxylierung inhibiert ebenfalls die *cadBA*-Expression. Die Expression chromosomaler *cadA-lacZ*-Fusionen in *E. coli* konnte durch die Zugabe von 1,3 mM Cadaverin zum Medium praktisch vollständig reprimiert werden (Neely *et al.*, 1994). Primer-Extension-Analysen zeigten, dass diese Inhibition bereits auf transkriptioneller Ebene stattfindet (Neely und Olson, 1996).

CO<sub>2</sub> als zweites Endprodukt könnte ebenfalls ein Inhibitor der *cadBA*-Expression sein. Die Zugabe von 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zum Medium verringerte die Expression von *cadB-lacZ*-Fusionen in *E. coli* um ca. 50% (Takayama *et al.*, 1994). Ob diese Repression auf transkriptioneller oder translationaler Ebene stattfindet, ist unbekannt.

### **Untersuchungen zur Aktivierung von ToxR**

In den ToxR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren erfolgt die Wahrnehmung des Reizes und die Antwort auf diesen Reiz, z. B. in Form der Aktivierung der *cadBA*-Transkription, innerhalb eines Proteins. Bei den weit verbreiteten bakteriellen Zwei-Komponenten-Systeme, die zumeist aus einer membrangebundenen Sensorkinase und einem löslichen Antwortregulator bestehen, erfolgt die Reizweiterleitung durch den Transfer von Phosphorylgruppen. Dieser charakteristische Phosphorylgruppentransfer findet in den ToxR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren nicht statt.

Das bisher am intensivsten charakterisierte Mitglied dieser Proteinfamilie ist ToxR, der Regulator des sog. „ToxR-Virulenz-Regulons“ in *V. cholerae*. Miller *et al.* (1987) konnten nachweisen, dass ToxR die Transkription des *ctx*-Operons in *V. cholerae* in Abhängigkeit vom pH-Wert, der Aminosäurezusammensetzung, der Temperatur und der Osmolarität des Mediums aktiviert. In derselben Veröffentlichung zeigten die Autoren des weiteren, dass die periplasmatische Domäne von ToxR gegen das Protein PhoA ausgetauscht werden konnte, und die ToxR-PhoA Hybridproteine die *ctx*-Expression weiterhin regulieren konnten. Da PhoA als Dimer vorliegt, wurde anhand der Ergebnisse spekuliert, ob ToxR möglicherweise unter nicht-induzierenden Bedingungen im inaktiven Zustand als Monomer vorliegt und induzierende Bedingungen eine Dimerisierung und damit eine Aktivierung von ToxR bewirken. In folgenden Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die dimeren Hybridproteine ToxR-PhoA und ToxR-GCN4 eine signifikant stärkere *ctx*-Expression induzieren als die monomeren Hybridproteine ToxR-MalE und ToxR-Bla (Dziejman und Mekalanos, 1994; Kolmar *et al.*, 1995). Des weiteren konnte die Dimerisierung von ToxR sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt werden (Ottemann und Mekalanos, 1995; 1996). Allerdings konnte nicht nachgewiesen werden, dass die Dimerisierung von ToxR der entscheidende Mechanismus für das Umschalten von einer inaktiven in eine aktive Form ist, da ToxR sowohl unter induzierenden als auch unter nicht-induzierenden Bedingungen Dimere



ausbildete (Dziejman *et al.*, 1999).

In *V. cholerae* ist ToxR an der direkten Regulation der Gene *ctx*, *toxT*, *ompT* und *ompU* beteiligt. Untersuchungen zu der transkriptionellen Regulation der verschiedenen Gene indizierten, dass ToxR die Genexpression auf unterschiedliche Art und Weise reguliert. Bei der Aktivierung von *ompU* (Crawford *et al.*, 1998) und *ctx* bindet ToxR kooperativ an spezifische Bindestellen innerhalb der Promotorregionen und ist der direkte Aktivator der Transkription. Innerhalb der *toxT*-Promotorregion hingegen bindet ToxR an ein „Inverted Repeat“-Motiv, von wo aus es den ToxR-ähnlichen Transkriptionsaktivator TcpP rekrutiert (Krukoniš *et al.*, 2000). TcpP wiederum aktiviert die Transkription von *toxT*. Bei der Repression der *ompT*-Gens bindet ToxR an einer Bindestelle, die mit dem *ompT*-Promotor überlappt, wodurch die Bindung der RNA-Polymerase verhindert wird (Li *et al.*, 2002). Eine Konsensussequenz für die Bindung von ToxR auf der DNA existiert nicht.

Die stark variierenden Strukturen der Promotorregionen und die unterschiedlichen Funktionen von ToxR bei der Regulation verschiedener Gene erschweren die Identifikation eines Aktivierungsmechanismus. Daher konnte auch durch die Charakterisierung von ToxR nicht die generellen Prinzipien der Signaltransduktion und der Aktivierung der ToxR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren aufgeklärt werden.

### **Membrangebundene Transkriptionsfaktoren in Pro- und Eukaryonten**

Auch in eukaryontischen Zellen wurden membranintegrierte Transkriptionsregulatoren beschrieben, die mit einer zytosolischen Domäne, einer einzelnen Transmembrandomäne und einer extrazytosolischen Domäne eine ähnliche Topologie wie die ToxR-ähnlichen Regulatoren aufweisen. Zu diesen eukaryontischen Transkriptionsfaktoren gehören z. B. Notch (Lieber *et al.*, 1993), ATF6 (Haze *et al.*, 1999) oder Ire1 (Niwa *et al.*, 1999). Diese Proteine sind sowohl ligandenbindende Rezeptoren als auch direkte Regulatoren der Genexpression.

Die Membranintegration dieser Rezeptoren erlaubt zwar die extrazelluläre Reizwahrnehmung, verhindert aber gleichzeitig den Eintritt in den Nukleus und damit die Bindung an die DNA. Die Problematik, wie die Translokation in den Nukleus vonstatten geht, konnte in den letzten Jahren durch die Aufklärung des Mechanismus der Regulierten Proteolyse (RP) gelöst werden. Bei diesem Aktivierungsmechanismus wird der zytosolische, DNA-bindende Teil des Proteins durch proteolytische Spaltung vom membranintegrierten Teil abgelöst und kann so in den Nukleus eindringen.

Gut untersucht ist dieser Mechanismus im Fall des Zelloberflächenrezeptors Notch. Die Bindung des Delta-Proteins, dem Liganden von Notch, an die extrazytosolische Domäne von Notch führt zunächst zu einer proteolytischen Spaltung durch die Protease TACE in der extrazytosolischen

Domäne, 12 As entfernt von der Transmembrandomäne (Brou *et al.*, 2000). Die verkürzte Transmembran-Untereinheit wird anschließend innerhalb der Transmembrandomäne durch die Protease Presinilin-1 gespalten, was zur Freisetzung der zytosolischen Domäne von Notch (NICD) führt (De Stropper *et al.*, 1999). NICD kann in den Nukleus eindringen und bindet dort an das Protein CSL (Rand *et al.*, 2000). CSL ist im Nukleus ein transkriptioneller Repressor, NICD/CSL hingegen ist ein transkriptioneller Aktivator von verschiedenen Zielgenen, z. B. der HES-Familie. Die Aktivität von NICD im Nukleus wird durch Ubiquitinierung und anschließende proteolytische Degradation kontrolliert (Oberg *et al.*, 2001).

In prokaryontischen Zellen wurde der Mechanismus der RP besonders für die Freisetzung des alternativen  $\sigma$ -Faktors  $\sigma^E$  in *E. coli* untersucht (Ades, 1999). RseA ist ein integrales Membranprotein mit einer N-terminalen zytoplasmatischen Domäne, einer Transmembrandomäne und einer C-terminalen periplasmatischen Domäne. Unter Nicht-Stressbedingungen ist  $\sigma^E$  an die zytoplasmatische Domäne von RseA gebunden und wird dadurch in einer inaktiven Konformation fixiert. Wenn das vermehrte Auftreten von un- oder mißgefalteten Proteinen im Periplasma Stressbedingungen signalisiert, wird RseA zunächst von der Protease DegS in der periplasmatischen Domäne und anschließend von der Protease YaeL in der Transmembrandomäne oder der zytoplasmatischen Domäne geschnitten, was letztlich zur Freisetzung von  $\sigma^E$  führt, der anschließend an das Core-Enzym der RNA-Polymerase binden und die Expression verschiedener Stress-induzierter Gene regulieren kann (Alba *et al.*, 2002; Kanehara *et al.*, 2002).

## Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit ist eine biochemische Charakterisierung des membranintegrierten Transkriptionsregulators CadC.

Der molekulare Mechanismus der Aktivierung der ToxR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren ist bislang unbekannt. Für ein besseres Verständnis dieses Mechanismus sollen zunächst die Bindestellen von CadC in der regulatorischen Region des *cadBA*-Operons identifiziert und die Bindung von CadC an diese Seiten *in vitro* und *in vivo* charakterisiert werden.

Mittels biochemischer und molekularbiologischer Methoden soll der oligomere Zustand von CadC analysiert werden. Insbesondere soll untersucht werden, ob CadC durch einen von den Umgebungsbedingungen modulierten Wechsel von einem monomeren zu einem oligomeren Zustand aktiviert werden könnte.

Eukaryontische Transkriptionsfaktoren, die eine ähnliche Transmembrantopologie wie CadC besitzen, werden durch eine Regulierte Proteolyse (RP) aktiviert, wobei die transkriptionsaktivierende Untereinheit durch Proteolyse vom membranständigen Teil des Proteins abgespalten wird. Es soll untersucht werden, ob

CadC durch einen ähnlichen Mechanismus aktiviert wird.

In Zusammenarbeit mit dem Department für Physik der LMU München soll die Modellierung eines pH-Stress-Moduls etabliert werden. Dafür soll die Expression des Cad-Systems während einer simulierten Magenpassage analysiert und anhand der Daten ein *in silico* Modell der Regulation des *cadBA*-Operons aufgestellt werden. Im Rahmen dieser Untersuchungen soll die physiologische Funktion des Cad-Systems für *E. coli* untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

Restriktionsenzyme	New England Biolabs (NEB) (Frankfurt)
Alkalische Phosphatase	NEB (Frankfurt)
T4 DNA-Ligase	NEB (Frankfurt)
T4 Polynukleotidkinase	NEB (Frankfurt)
Rinderserumalbumin	NEB (Frankfurt)
Taq-DNA-Polymerase	Gibco/BRL (Eggenstein)
DNA-Standard (1 kb oder 100 bp)	NEB (Frankfurt)
HMW-Proteinstandard	Sigma (Deisenhofen)
“Prestained”-HMW-Proteinstandard	Sigma (Deisenhofen)
DNase	Sigma (Deisenhofen)
PMSF	Sigma (Deisenhofen)
ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktosid	Sigma (Deisenhofen)
Tri-Nitro-Benzolsulfonsäure	Sigma (Deisenhofen)
Dansylchlorid	Sigma (Deisenhofen)
Alkalische Phosphatase konjugiertes	
Anti-Rabbit IgG	GE Healthcare (Braunschweig)
Penta-His-Anti-Mouse-IgG	GE Healthcare (Braunschweig)
[ $\gamma^{32}$ -P]ATP	GE Healthcare (Braunschweig)
[ $\gamma^{32}$ -P]CTP	GE Healthcare (Braunschweig)
[ $\alpha^{32}$ -P]CTP	GE Healthcare (Braunschweig)
CnBr-Sepharose 4B	GE Healthcare (Braunschweig)
QIAprep-spin Plasmid Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
QIAquick-Gel-Extraction Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
QIAquick-PCR-Purification Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
Nucleotid Removal Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
DNeasy Tissue Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose	Qiagen GmbH (Hilden)
Bio-Beads	BioRad (München)
Proteinstandard Precision Plus	BioRad (München)
Nitrozellulose-Membran	Schleicher&Schuell (Dassel)

Nylon-Membran	GE Healthcare (Braunschweig)
Protogel-Fertiglösung	Biozym Diagnostics (Hess. Oldendorf)
<i>E. coli</i> Lipide	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
Lauryldimethylaminoxid	Calbiochem (La Jolla, Kalifornien)
<i>N</i> -Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid	Calbiochem (La Jolla, Kalifornien)
Phenol-Chloroform	Fa. Roth (Karlsruhe)
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Fa. Roth (Karlsruhe)
Ponceau-Rot-S	Fa. Roth (Karlsruhe)

Alle hier nicht aufgeführten Materialien wurden von den Firmen Bayer (Leverkusen), Biomol (Hamburg), BioRad (München), Biozym Diagnostics GmbH (Hess. Oldendorf), Fluka (Neu-Ulm), Gibco/BRL (Eggenstein), ICN Biomedicals Inc. (Aurora, Ohio), E. Merck (Darmstadt), Riedel-de Häen (Seelze), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) im Reinheitsgrad "pro analysis" bezogen.

## 2.2 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in Tab. 2.1, die verwendeten Plasmide in Tab. 2.2 und die verwendeten Oligonukleotide in Tab. 2.3 aufgeführt.

**Tabelle 2.1: Verwendete Stämme**

Stamm	Genotyp	Referenz
JM109	<i>recA1 endA1 gyrA96 hsdR17 supE44 relA1</i> $\Delta(lac-proAB)/F'[traD36 proAB^* lacI^q$ <i>lacZ\Delta M15]</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
BL21(DE3)- pLysS	$F^- ompT r_B^- m_B^-$	Studier und Moffat (1986)
LMG194	$F^- \Delta lacX74 galE galK thi rpsL \Delta phoA$ (PvuII) $\Delta ara714 leu::Tn10$	Guzman <i>et al.</i> (1995)
MC4100	$F^- araD139 (argF-lac)U169 rpsL150 relA$ <i>flb-5301 ptsF25 deoC1</i>	Casabadan und Cohen (1979)
EP314	$F^- IN(rrnD-rrnE) \Delta(lacIOPZYA) exa-1::Mu$ DI1734(Km <i>lac</i> ) <i>cadC1::Tn10</i>	Neely <i>et al.</i> (1994)
W3110- $\Delta cadC$	$F^- IN(rrnD-rrnE) cadC::Kan$	Soksawatmaekhin <i>et al.</i> (2004)

MG1655	K12 Referenz-Stamm	Blattner <i>et al.</i> (1997)
MG1655- $\Delta cadC$	MG1655 <i>cadC::Kan</i> [MG1655 X P1 (W3110- $\Delta cadC$ )]	diese Arbeit
MG1655- $\Delta lacZ$	MG1655 <i>lacZ::tet</i>	K. Jahreis (Universität Osnabrück, persönliche Gabe)
MG1655- $\Delta lacZ$ - $\Delta cadC$	MG1655- $\Delta LacZ$ <i>cadC::Kan</i> [MG1655- $\Delta lacZ$ X P1(W3110- $\Delta cadC$ )]	diese Arbeit
CK1	MG1655- $\Delta lacZ$ ( $\lambda$ RZ5-Cad1-2)	diese Arbeit
CK2	MG1655- $\Delta lacZ$ ( $\lambda$ RZ5- $\Delta$ Cad1)	diese Arbeit
CK3	MG1655- $\Delta lacZ$ ( $\lambda$ RZ5- $\Delta$ Cad2)	diese Arbeit
CK4	MG1655 <i>his<sub>10</sub>-cadC</i>	diese Arbeit
PD32	MC4100 <i>h-ns::amp</i>	Dersch <i>et al.</i> , 1993
PD32- $\Delta cadC$	PD32 <i>cadC::Kan</i> [PD32 X P1(W3110- $\Delta cadC$ )]	diese Arbeit
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> 080 <i>lacZ</i> DM15 $\Delta(lacZYA-argF)$ U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE441 thi1 gyrA96 relA1</i>	Promega
JH372	F <sup>-</sup> <i>hsdR mcrB araD139</i> $\Delta(araABC-leu)$ $\Delta$ 7679 <i>lacX74 galU galK rpsL thi128 lacIq lacZ::Tn5</i> [ $\lambda$ 202], Km <sup>r</sup>	Hu <i>et al.</i> , 1990
JH607	F <sup>-</sup> <i>hsdR mcrB araD139</i> $\Delta(araABC-leu)$ $\Delta$ 7679 <i>lacX74 galU galK rpsL thi128 lacIq lacZ::Tn5</i> [ $\lambda$ 112O <sub>S</sub> P <sub>S</sub> ], Km <sup>r</sup>	Zeng und Hu, 1997

Tabelle 2.2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Resistenz	Genotyp	Herkunft
<b>Allgemein verwendete Plasmide</b>			
pET-16b- <i>cadC</i>	Ap <sup>R</sup>	<i>cadC</i> in pET-16b	Küper (2001)
pUC19	Ap <sup>R</sup>	Klonierungsvektor	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
pUC19- <i>cadC</i>	Ap <sup>R</sup>	<i>his<sub>10</sub>-cadC</i> in pUC19	diese Arbeit
<b>Plasmide für Untersuchungen zur Aktivität und Lokalisation von verkürzten CadC-Derivaten</b>			
pUC19- <i>cadC</i> 1-103	Ap <sup>R</sup>	<i>his<sub>10</sub>-cadC 1-103</i> in pUC19	diese Arbeit
pUC19- <i>cadC</i> 1-159	Ap <sup>R</sup>	<i>his<sub>10</sub>-cadC 1-159</i> in pUC19	diese Arbeit
pUC19- <i>cadC</i> 1-164	Ap <sup>R</sup>	<i>his<sub>10</sub>-cadC 1-164</i> in pUC19	diese Arbeit
pUC19- <i>cadC</i> 1-169	Ap <sup>R</sup>	<i>his<sub>10</sub>-cadC 1-169</i> in pUC19	diese Arbeit
pUC19- <i>cadC</i> 1-174	Ap <sup>R</sup>	<i>his<sub>10</sub>-cadC 1-174</i> in pUC19	diese Arbeit
pUC19- <i>cadC</i> 1-179	Ap <sup>R</sup>	<i>his<sub>10</sub>-cadC 1-179</i> in pUC19	diese Arbeit
pUC19- <i>cadC</i> 1-183	Ap <sup>R</sup>	<i>his<sub>10</sub>-cadC 1-183</i> in pUC19	diese Arbeit
pUC19- <i>cadC</i> 1-187	Ap <sup>R</sup>	<i>his<sub>10</sub>-cadC 1-187</i> in pUC19	diese Arbeit
pUC19- <i>cadC</i> 1-215	Ap <sup>R</sup>	<i>his<sub>10</sub>-cadC 1-215</i> in pUC19	diese Arbeit
pBAD24	Ap <sup>R</sup>	Expressionsvektor	Guzman <i>et al.</i> (1995)
pBAD24- <i>cadC</i>	Ap <sup>R</sup>	<i>his<sub>10</sub>-cadC</i> in pBAD24	diese Arbeit
pBAD24- <i>cadC</i> 1-103	Ap <sup>R</sup>	<i>his<sub>10</sub>-cadC 1-103</i> in pBAD24	diese Arbeit
pBAD24- <i>cadC</i> 1-159	Ap <sup>R</sup>	<i>his<sub>10</sub>-cadC 1-159</i> in pBAD24	diese Arbeit
pBAD24- <i>cadC</i> 1-164	Ap <sup>R</sup>	<i>his<sub>10</sub>-cadC 1-164</i> in pBAD24	diese Arbeit
pBAD24- <i>cadC</i> 1-169	Ap <sup>R</sup>	<i>his<sub>10</sub>-cadC 1-169</i> in pBAD24	diese Arbeit
pBAD24- <i>cadC</i> 1-174	Ap <sup>R</sup>	<i>his<sub>10</sub>-cadC 1-174</i> in pBAD24	diese Arbeit
pBAD24- <i>cadC</i> 1-179	Ap <sup>R</sup>	<i>his<sub>10</sub>-cadC 1-179</i> in pBAD24	diese Arbeit
pBAD24- <i>cadC</i> 1-183	Ap <sup>R</sup>	<i>his<sub>10</sub>-cadC 1-183</i> in pBAD24	diese Arbeit
pBAD24- <i>cadC</i> 1-187	Ap <sup>R</sup>	<i>his<sub>10</sub>-cadC 1-187</i> in pBAD24	diese Arbeit
pBAD24- <i>cadC</i> 1-215	Ap <sup>R</sup>	<i>his<sub>10</sub>-cadC 1-215</i> in pBAD24	diese Arbeit
<b>Plasmide für die Analyse der <i>cadBA</i>-Promotorregion</b>			
pUC19-P <sub>Cad</sub> 150	Ap <sup>R</sup>	bp -150 bis +72 von P <sub>Cad</sub> in pUC19	diese Arbeit

pUC19-P <sub>Cad</sub> 181	Ap <sup>R</sup>	bp -181 bis +72 von P <sub>Cad</sub> in pUC19	diese Arbeit
pUC19-P <sub>Cad</sub> 221	Ap <sup>R</sup>	bp -221 bis +72 von P <sub>Cad</sub> in pUC19	diese Arbeit
pUC19-P <sub>Cad</sub> 260	Ap <sup>R</sup>	bp -260 bis +72 von P <sub>Cad</sub> in pUC19	diese Arbeit
pUC19-P <sub>Cad</sub> 290	Ap <sup>R</sup>	bp -290 bis +72 von P <sub>Cad</sub> in pUC19	diese Arbeit
pUC19-P <sub>Cad</sub> 600	Ap <sup>R</sup>	bp -600 bis +72 von P <sub>Cad</sub> in pUC19	diese Arbeit
pRS415	Ap <sup>R</sup>	Promotor-Test-Vektor	(Simons <i>et al.</i> , 1987)
pRS415-Cad1-2	Ap <sup>R</sup>	bp -150 bis +72 von P <sub>Cad</sub> in pRS415	diese Arbeit
pRS415-ΔCad1	Ap <sup>R</sup>	bp -89 bis +72 von P <sub>Cad</sub> in pRS415	diese Arbeit
pRS415-ΔCad2	Ap <sup>R</sup>	bp -150 bis +72 von P <sub>Cad</sub> (Δbp -89 bis -59) in pRS415	diese Arbeit
pRS551	Ap <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Promotor-Test-Vektor	(Simons <i>et al.</i> , 1987)
pRS551-P <sub>Cad</sub> 150	Ap <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	bp -150 bis +72 von P <sub>Cad</sub> in pRS551	diese Arbeit
pRS551-P <sub>Cad</sub> 181	Ap <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	bp -181 bis +72 von P <sub>Cad</sub> in pRS551	diese Arbeit
pRS551-P <sub>Cad</sub> 221	Ap <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	bp -221 bis +72 von P <sub>Cad</sub> in pRS551	diese Arbeit
pRS551-P <sub>Cad</sub> 260	Ap <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	bp -260 bis +72 von P <sub>Cad</sub> in pRS551	diese Arbeit
pRS551-P <sub>Cad</sub> 290	Ap <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	bp -290 bis +72 von P <sub>Cad</sub> in pRS551	diese Arbeit
pRS551-P <sub>Cad</sub> 600	Ap <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	bp -600 bis +72 von P <sub>Cad</sub> in pRS551	diese Arbeit
<b>Plasmide für den Transfer von <i>his</i><sub>10</sub>-<i>cadC</i> auf das <i>E. coli</i>-Chromosom</b>			
pBSK-(II)	Ap <sup>R</sup>	Klonierungsvektor	Stratagene
pBSK-II-CadC-Insert	Ap <sup>R</sup>	pBSK- <i>cadC</i> +/-500-Kn + I- <i>Sce</i> I-Schnittstellen	diese Arbeit
pBSK- <i>cadC</i> 500	Ap <sup>R</sup>	<i>his</i> <sub>10</sub> - <i>cadC</i> (bp1-500) in pBSK-(II)	diese Arbeit
pBSK- <i>cadC</i> +/-500	Ap <sup>R</sup>	pBSK- <i>cadC</i> 500 +500 bp stromaufwärts von <i>cadC</i>	diese Arbeit
pBSK- <i>cadC</i> +/-500-Kn	Ap <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	pBSK- <i>cadC</i> +/-500 + Kanamycin-Kassette in <i>Nco</i> I-Seite	diese Arbeit
<b>Plasmide für die Konstruktion von λCI-CadC Hybridproteinen</b>			
pJH391	Ap <sup>R</sup>	λCI- <i>lacZ</i>	(Hu <i>et al.</i> , 1990)
pKH101	Ap <sup>R</sup>	λCI	(Hu <i>et al.</i> , 1990)
pJH370	Ap <sup>R</sup>	λCI-GCN4	(Hu <i>et al.</i> , 1990)
pJH622	Ap <sup>R</sup>	λCI-GCN4'	(Hu <i>et al.</i> , 1990)
pJH391- <i>cadC</i>	Ap <sup>R</sup>	λCI- <i>cadC</i>	diese Arbeit



Tabelle 2.3: Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz
<b>Primer zur <i>in vivo</i> Analyse des <i>cadBA</i>-Promotorbereichs</b>	
Cad1- <i>EcoRI</i> -sense	5'-GGAATTCTTGTAACATTAATGTTTATCTT-3'
Pcad -181	5'-AGAATTCAAATTTAACCAGAGAATG-3'
Pcad -221	5'-AGAATTCATGTTGCGGCAATTTATT-3'
Pcad -261	5'-AGAATTCTATTTGTTGTTGAGTTTT-3'
Pcad -290	5'-AGAATTCGTAACTCCGGGTTGATTT-3'
Pcad-600	5'-AGAATTCCTCGGAATTGAACAACATG-3'
Cad- <i>Bam</i> HI-anti	5'-CGGGATCCCATGCTCTTCTCCTAATTTCAATTT-3'
Cad2-Del- <i>Xba</i> I-sense	5'-AATCTAGAGTGTTATTTACCTAATCTTTAGGATT-3'
Cad2-Del- <i>Xho</i> I-anti	5'-TTCTCGAGTTTTATTAACACATCAGGATCGCA-3'
Cad2-Replace-sense	5'-AACTCTAGAACGTAGCTTCAGCCATATCCTCGA GTCC-3'
Cad2-Replace-anti	5'-GGACTCGAGATGGGGAGAAGCTACGTTCTAGAGTT-3'
Cad2- <i>EcoRI</i> -sense	5'-GGAATTCAACCTCAAGTTCTCACTTACAGAA-3'
Cad- <i>Hind</i> III anti	5'-AATAAGCTTCATGCTCTTCTCCTAATTTCAATTT-3'
<b>Primer für Footprint-Experimente</b>	
5-Fam-Cad	5'-TTTATTTGCCGCATAATTTTTATT-3'
CadB-antisense	5'-ACGATAGCAATACAGGCGATACCCGC-3'
<b>Primer für Transkriptionsanalysen</b>	
CadB- <i>Bam</i> HI-sense	5'-AGGGATCCATGAGTTCTGCCAAGAAGATCGGGCT-3'
CadB-antisense	5'-ACGATAGCAATACAGGCGATACCCGC-3'
<b>Oligonukleotide für Gel -Retardations-Experimente</b>	
Cad5- <i>Pst</i> I-sense	5'-GCCTGCAGTTGTAACATTAATGTTTATCTT-3'
Cad6	5'-AAACCTCAAGTTCTCACTTACAGAACTTT-3'

Cad6-Del- <i>Xho</i> I-anti	5'-TTCTCGAGTTTTATTAACACATCAGGATCGCA-3'
Cad6-anti	5'-AAAGTTTCTGTAAAGTGAGAACTTGAGGTTT-3'
Cad5	5'-TGTAACATTAATGTTTATCTTTTCATGATAT CAACTTGCGAT-3'
Cad5-anti	5'-ATCGCAAGTTGATATCATGAAAAGATAAACATT TAATGTTTACA-3'
<b>Primer zur Konstruktion verkürzter <i>cadC</i>-Derivate</b>	
CadC- <i>Nde</i> I-sense	5'-AGGAAAGGACATATGCAACAACCTGTAGTTCG-3'
CadC 1-103 anti	5'-CCAATGCATTTATTATTACGGCACCATTAATTTATA-3'
CadC 1-159 anti	5'-CCAATGCATTTATTATTA AAAAGGTAGTGAATCGTTT-3'
CadC 1-164 anti	5'-CCAATGCATTTATTATTA AAAAAACCATACCCA-3'
CadC 1-169 anti	5'-CCAATGCATTTATTATTATAACGACAACAGGAA-3'
CadC 1-174 anti	5'-CCAATGCATTTATTATTATGCTACACAGATACC-3'
CadC 1-179 anti	5'-CCAATGCATTTATTATTATGAAAACGCTACCAG-3'
CadC 1-184 anti	5'-CCAATGCATTTATTATTAACGTGTATCAAGACT-3'
CadC 1-187 anti	5'-CCAATGCATTTATTATTACATAGGAAGACGTGTATC-3'
CadC 1-215 anti	5'-CCAATGCATTTATTATTAACGGGGA ACTCCAGCT-3'
<b>Primer zur Konstruktion von <math>\lambda</math><i>cl-cadC</i> Fusionen</b>	
CadC- <i>Sal</i> I-sense	5'-AGTGTCGACGCAACAACCTGTAGTTCGC-3'
CadC- <i>Bam</i> HI-Stop	5'-AGTGGATCCTTATTCTGAAGCAAGAAATTTGTCC-3'
<b>Primer für den Transfer von <i>his</i><sub>10</sub>-<i>cadC</i> auf das <i>E. coli</i>-Chromosom</b>	
<i>Xba</i> I-ATG-6His	5'-GCTCTAGATGCATCATCATCATCATCAT- 3'
<i>cadC</i> +500 sense	5'-AAACTGCAGAGCAATTTGCGGGCATAT-3'
<i>cadC</i> +500 anti	5'-GCTCTAGAAATAGAAACTCATTTCGAA-3'
<i>Sce</i> I- <i>Sac</i> 1- <i>Sac</i> 2-CadC	5'-GGAGCTCTAGGGATAACAGGGTAATCCGCGGAA ATGACGTCATCAGGAG-3'
His-CadC in-anti	5'-GGAATTCTAGGGATAACAGGGTAATGGATCCAG GGAGAATCTGTGGCAG-3'

### 2.3 Anzuchtverfahren

Es wurden folgende Medien verwendet: LB-Medium (1% (w/v) Trypton, 1% (w/v) NaCl, 0,5% (w/v) Hefeextrakt); LB 5,8 (LB-Medium, mit 100 mM Na-Phosphatpuffer pH 5,8); LB 7,6 (LB-Medium, mit Na-Phosphatpuffer pH 7,6); als Minimalmedien wurden phosphatgepufferte Medien nach Epstein und Kim (1971) eingesetzt, die 1 mg/l Thiamin und 0,4% (w/v) Glukose als C-Quelle enthielten und mit 100 mM Na-Phosphatpuffer bei pH 7,6 oder pH 5,8 gepuffert waren. Nährböden wurden durch Zugabe von 1,5% (w/v) Agar hergestellt. Antibiotika wurden in Konzentrationen von 100 µg/ml (Ampicillin, Carbenicillin), 50 µg/ml (Kanamycin) bzw. 34 µg/ml (Chloramphenicol) zugesetzt. Die Anzucht der Zellen erfolgte aerob bei 37°C. Die Optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Uvikon 943-Spektralphotometer (Kontron Instruments) bestimmt.

#### 2.3.1 Induktion und Aktivität des Cad-Systems

Für die Charakterisierung der Induktion und Aktivität des Cad-Systems wurden Zellen des *E. coli*-Wildtypstamms MG1655 wie folgt kultiviert: eine Übernachtskultur des Stammes wurde 1:100 in LB-Medium verdünnt und in einem Fermenter BiostatB der Firma Sartorius bei 37°C und aeroben Bedingungen bis zu einer  $OD_{600} \sim 1$  angezogen. Zu diesem Zeitpunkt wurde durch Zugabe von HCl (2 N) der pH-Wert des Mediums auf 5,5 eingestellt, durch Begasung mit einem Mischgas (85% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>) mikroaerophile Bedingungen geschaffen und die Zellen für weitere 120 min kultiviert. Alle 5 min wurden Proben genommen und anhand dieser die *cadBA*-Transkription (2.4.8 und 2.4.9), die Lysin-Decarboxylase-Aktivität in Zellextrakten als Maß für die *cadA*-Expression (2.5.9), die Konzentration von Cadaverin und Lysin im Medium (2.5.10), der pH-Wert des Mediums und die Gesamtzellzahl und die Lebendzellzahl der Kultur analysiert.

Derselbe Versuch wurde auch mit MG1655- $\Delta cadC$  durchgeführt, hier wurden allerdings nur der pH-Wert des Mediums, die Gesamtzellzahl und die Lebendzellzahl bestimmt.

Um zu testen, ob die Wachstumsphase einen Einfluss auf die Induktion und Aktivität des Cad-System hat, wurden Zellen des Wildtyps MG1655 bis zur stationären Phase kultiviert, mit Hilfe eines Zellkonzentrators (Sartorius) gesammelt, in frischem LB-Medium resuspendiert und eine  $OD_{600} \sim 1$  eingestellt und dann sofort induziert (pH 5,5; mikroaerophile Bedingungen).

#### 2.3.2 Phänotypische Charakterisierung einer *cadC*-Mutante

Für phänotypische Untersuchungen wurden Zellen der *E. coli*-Stämme MG1655 oder MG1655- $\Delta cadC$  in LB-Medium pH 7 bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von Na-Phosphatpuffer (pH 5,8) in einer

Endkonzentration von 100 mM für 30 min an einen niedrigen pH-Wert adaptiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt, in LB-pH 3-Medium (LB-Medium, das durch Zugabe von HCl auf pH 3 eingestellt worden war) resuspendiert und 120 min inkubiert. Lebendzellzahlen (LZZ) wurden 0, 20, 40, 60 und 120 min nach Beginn der Inkubation bei pH 3 durch Ausplattieren der Zellen auf LB-Agarplatten bestimmt. Während der Adaptation und der Inkubation bei pH 3 wurde MG1655- $\Delta cadC$  mit 0 oder 10 mM Cadaverin supplementiert.

Um den Einfluss von externem Cadaverin auf die LZZ zu untersuchen, wurde derselbe Versuch mit *E. coli* MG1655- $\Delta cadC$  wiederholt, wobei die Zellen aber während der Adaptation und der Inkubation bei pH 3 mit Cadaverin in Konzentrationen von 0; 0,5; 2; 6; 8 und 10 mM supplementiert wurden. Die Lebendzellzahl wurde nur nach 120 min bestimmt.

Um herauszufinden, ob der positive Einfluss von Cadaverin auf die LZZ nach einem Säureschock auf eine Erhöhung des externen pH-Wertes oder möglicherweise auf andere Faktoren zurückzuführen war, wurde der Effekt von Cadaverin auf den pH-Wert durch zusätzliche Titration von HCl zu dem Medium aufgehoben. Konkret wurde zunächst das Medium auf pH 3,0 eingestellt, dann mit 10 mM Cadaverin supplementiert, wodurch der pH-Wert auf etwa 3,6 stieg, und schließlich mit HCl wieder auf 3,0 eingestellt (LB-Cadaverin-pH 3-Medium). MG1655- $\Delta cadC$  wurde in LB bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und dann 30 min bei pH 5,8 adaptiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation gesammelt und in LB-pH 3-Medium oder in LB-pH 3-Cadaverin-Medium resuspendiert, 120 min inkubiert und die Lebendzellzahl bestimmt. Zellen, die in LB-pH 3-Cadaverin-Medium inkubiert wurden, waren auch während der Adaptation bei pH 5,8 mit 10 mM Cadaverin supplementiert.

pH-Werte des LB-Mediums zwischen 3 und 1 wurden durch Zugabe von HCl eingestellt. Eventuell ausfallende Bestandteile des Mediums wurden durch Zentrifugation entfernt.

### 2.3.3 *In vivo* Analyse der *cadBA*-Promotorregion

Für die *in vivo* Analyse des *cadBA*-Promotorbereichs wurden die Zellen der *E. coli*-Stämme CK1, CK2 und CK3 in LB-Medium oder in Minimalmedium nach Epstein und Kim (1971) bei pH 5,8 oder pH 7,6 kultiviert. Lysin wurde in einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben. Die Zellen wurden unter aeroben Bedingungen bis zu einer  $OD_{600} \sim 1$ , unter anaeroben Bedingungen bis zu einer  $OD_{600} \sim 0,5$  angezogen und anschließend die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach Miller (1972) bestimmt.

Zellen der *E. coli*-Stämme MC4100 und PD32 wurden mit den Plasmiden pRS551- $P_{Cad150}$ , pRS551- $P_{Cad181}$ , pRS551- $P_{Cad221}$ , pRS551- $P_{Cad260}$ , pRS551- $P_{Cad290}$  und pRS551- $P_{Cad600}$  transformiert. Für die Analyse der pH-abhängigen Repression der *cadBA*-Expression wurden

Übernachtskulturen der transformierten Stämme 1:100 in Minimalmedium verdünnt und unter aeroben Bedingungen bei pH 5,8 oder pH 7,6 bis zu einer OD<sub>600</sub> ~1 kultiviert und anschließend die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach Miller (1972) bestimmt. Für die Analyse der O<sub>2</sub>-abhängigen Repression der *cadBA*-Expression wurden Übernachtskulturen der transformierten Stämme 1:100 in Minimalmedium, zusätzlich supplementiert mit 10 mM Lysin und 0,2% Casaminsäuren, verdünnt und bei pH 5,8 und unter aeroben oder anaeroben Bedingungen bis zu einer OD<sub>600</sub> ~0,5 kultiviert. Anschließend wurden die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach Miller (1972) bestimmt.

### 2.3.4 Nachweis der N-terminalen Domäne von CadC

Für den Nachweis der N-terminalen Domäne von CadC im Zytoplasma wurde *E. coli* BL21/pET16b-*cadC* in LB 5,8 oder LB 7,6 bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und anschließend die Lokalisation der N-terminalen Domäne wie unter 2.5.7 beschrieben untersucht.

Für die Untersuchung der Lokalisation von His<sub>10</sub>-CadC in CK4 wurde der Stamm zunächst in LB-Medium bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und das Medium dann durch Zugabe von Na-Phosphatpuffer mit dem entsprechenden pH-Wert nach pH 5,8 oder 7,6 geschiftet. Nach 5-30 min wurde die Lokalisation der N-terminalen Domäne wie unter 2.5.7 beschrieben überprüft.

Für die Untersuchung der Lokalisation von CadC mit Hilfe von Gelretardationsexperimenten wurden die *E. coli*-Stämme LMG194/pBAD24-*cadC*, MG1655 und EP314 zunächst in LB-Medium bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und das Medium dann durch Zugabe von Na-Phosphatpuffer mit dem entsprechenden pH-Wert nach pH 5,8 oder 7,6 geschiftet. Nach 15 min wurden die Zellen geerntet und Membranfraktionen und zytoplasmatische Fraktionen wie unter 2.5.7 beschrieben präpariert.

### 2.3.5 Lokalisation und Funktionalität verkürzter CadC-Derivate

Für Lokalisationsuntersuchungen und Aktivitätsbestimmungen verkürzter CadC-Derivate wurden Zellen der Stämme LMG194 oder MG1655- $\Delta$ *cadC* mit den Plasmiden pBAD24-*cadC* 1-103, pBAD24-*cadC* 1-159, pBAD24-*cadC* 1-164, pBAD24-*cadC* 1-169, pBAD24-*cadC* 1-174, pBAD24-*cadC* 1-179, pBAD24-*cadC* 1-183, pBAD24-*cadC* 1-187, pBAD24-*cadC* 1-215 und pBAD24-*cadC* transformiert. Diese Plasmide kodieren für C-terminal verkürzte CadC-Derivate, das Plasmid pBAD24-*cadC* 1-103 für ein Derivat mit den Aminosäuren 1-103, das Plasmid pBAD24-*cadC* 1-159 für ein Derivat mit den Aminosäuren 1-159 usw., das Plasmid pBAD24-*cadC* für Wildtyp-CadC. Bei allen Derivaten handelte es sich um Hybridproteine, die N-terminal einen His-

Tag trugen. Für Lokalisationsuntersuchungen wurden Übernachtskulturen der transformierten LMG194-Zellen 1:100 in LB-Medium verdünnt und die Expression der CadC-Derivate mit 0.2% (w/v) Arabinose induziert. Die Zellen wurden bis zum Erreichen der stationären Phase kultiviert und dann geerntet. Die Lokalisation der jeweiligen Derivate wurde wie unter 2.5.7 beschrieben durchgeführt.

Für Aktivitätsbestimmungen wurden Übernachtskulturen transformierter MG1655- $\Delta cadC$ -Zellen 1:100 in LB 7,6 oder LB 5,8 mit oder ohne Zugabe von 0,2% (w/v) Arabinose verdünnt und bis zu einer  $OD_{600} \sim 1$  kultiviert. Anschließend wurde die Lysin-Decarboxylase-Aktivität in Zellextrakten wie unter 2.5.9 beschrieben bestimmt.

### **2.3.6 *In vivo* Oligomerisierung**

Um die Oligomerisierung von CadC *in vivo* zu testen, wurden Zellen wie folgt kultiviert: der *E. coli*-Stamm JH372 wurde mit den Plasmiden pJH391-*cadC*, pKH101 (Negativkontrolle) und pJH370 (Positivkontrolle) transformiert und die Transformanden und JH372 ohne Plasmid in LB5,8 oder LB 7,6 bis zur stationären Phase kultiviert und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach Miller (1972) bestimmt.

*E. coli* JH607 wurde mit den Plasmiden pJH391-*cadC*, pJH370 (Negativkontrolle) und pJH622 (Positivkontrolle) transformiert und die Transformanden und JH607 in LB 5,8 oder LB 7,6 bis zur stationären Phase kultiviert und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach Miller (1972) bestimmt.

## **2.4 Molekularbiologische und genetische Methoden**

### **2.4.1 Plasmidisolierung**

Plasmid-DNA wurde aus 5 ml Übernachtskulturen mittels des „QIAprep Spin Miniprep Kit“ nach Angaben des Herstellers isoliert.

### **2.4.2 Isolierung von chromosomaler DNA**

Chromosomale DNA wurde aus 1 ml Übernachtskultur *E. coli* MG1655 mittels des „DNeasy Tissue Kit“ nach Angaben des Herstellers isoliert.

### **2.4.3 Modifikation von DNA**

Die Standard DNA-Techniken wurden, falls nicht anders beschrieben, nach Maniatis *et al.* (1989)

durchgeführt. Die *in vitro*-Veränderungen von DNA-Molekülen wie Restriktionen und Ligationen wurden unter den vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Linearisierte Vektoren wurden zur Vermeidung von Religationen mit Alkalischer Phosphatase behandelt.

#### 2.4.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dafür wurden Gele mit 0,8-1,4 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris; 40 mM Essigsäure; 1 mM EDTA) verwendet, die mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid versetzt waren. Vor dem Lauf wurde 10 x DNA-Probenpuffer (50% (v/v) Glycerin ; 0,1 M EDTA; 1% (w/v) SDS; 0,25% (w/v) Bromphenolblau) zu den Proben gegeben. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgrößen diente 100 bp- oder 1 kb-Leiter-Standard. Der Gellauf wurde in einer „Mini Sub DNA Cell“-Agarosegel-Laufkammer (Bio-Rad) bei konstant 100 V für 30 min durchgeführt. Die Detektion der aufgetrennten DNA erfolgte auf einem UV-Transilluminator bei 304 nm und die Dokumentation der Gele mit der Gel-Dokumentationsanlage E.A.S.Y.store (Herolab, Wiesloch).

#### 2.4.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mittels des „QIAquick Gel Extraction Kit“ nach Angaben des Herstellers aus Agarosegelen isoliert.

#### 2.4.6 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von doppelsträngiger DNA erfolgte nach dem Prinzip des „Cycle Sequencing“, welches auf dem nach Sanger *et al.* (1977) beschriebenen Kettenabbruchverfahren mit Didesoxynukleotiden basiert. Die Sequenzreaktion erfolgte in einem Endvolumen von 20 µl mit 200-500 ng Plasmid-DNA, 3 pmol Primer und 4 µl „Big Dye Terminator Ready-Reaction“-Mix (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) in einem Thermocycler (Eppendorf, Hamburg). Die Denaturierung der doppelsträngigen DNA erfolgte dabei pro Reaktionszyklus für 0,5 min bei 96°C, das Anlagern der Primer für 0,25 min bei 45°C und die DNA-Amplifikation für 4 min bei 72°C. Nach 30 Zyklen wurde die Reaktion beendet und die Reaktionsansätze bis zur Weiterbearbeitung bei 4°C gekühlt. Die DNA wurde mit Hilfe des „DyeEx Spin“-Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die Proben wurden anschließend in einem „ABI Prism 377 DNA Sequenzer“ oder einem „ABI Prism 310 Genetic Analyser“ (PE Applied Biosystems) einer Elektrophorese unterzogen und ausgewertet (Spezielle Botanik, Universität Osnabrück).

Alternativ wurden DNA-Sequenzanalysen durch die Firma GATC (Konstanz) mit entsprechendem Plasmid und Primer durchgeführt und ausgewertet.

### 2.4.7 Präparation kompetenter Zellen und Transformation

Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte nach einer modifizierten RbCl-Methode (Promega Technical Manual, 1994). Zur Präparation von kompetenten Zellen wurde eine Übernachtskultur 1:100 in frisches LB-Medium überimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3-0,5 angezogen. Anschließend wurden die Zellen bei 4000 x g für 10 min abzentrifugiert und in dem halben Volumen kalter Lösung A (10 mM MOPS (pH 7,0); 10 mM RbCl) resuspendiert. Nach erneuter 10-minütiger Zentrifugation bei 4000 x g wurden die Zellen im gleichen Volumen kalter Lösung B (10 mM MOPS (pH 7,5); 50 mM CaCl<sub>2</sub>; 100 mM RbCl) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in kalter Lösung B (10 % des Ausgangsvolumens) aufgenommen und dann direkt für die Transformation verwendet. Für die Transformation wurden 200 µl kompetente Zellen mit 100-200 ng Plasmid-DNA oder einem kompletten Ligationsansatz mindestens 1 h auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (90 s bei 42°C) wurde zu jedem Ansatz 1 ml Medium gegeben und für mindestens 1 h aerob bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf geeigneten Selektionsnährböden ausplattiert. Bei Plasmidtransformationen wurden 100 µl des Transformationsansatzes ausplattiert; bei Transformationen mit Ligationsansätzen wurden die Zellen zunächst bei 4000 x g abzentrifugiert, in 100 µl Medium resuspendiert und dann ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.4.8 Isolierung von RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus *E. coli*-Zellen erfolgte entweder durch ein RNA-Isolations-Kit der Firma BioRad nach Angaben des Herstellers, oder mittels der sauren Phenol-Extraktion nach Aiba *et al.* (1981). Dazu wurden 10 ml Aliquots der Zellen 5 min bei 10000 x g pelletiert und das Pellet in 200 µl 20 mM Tris/HCl (pH 8,0) resuspendiert. Die Zellen wurden mit 3 ml Lysepuffer [20 mM Na-Acetat (pH 5,5), 0,5% (w/v) SDS, 1 mM EDTA (pH 8,0)] aufgeschlossen. RNA wurde mit 3 ml saurem Phenol bei 65°C extrahiert und die Lösung 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die RNA wurde erneut bei 65°C mit 3 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und anschließend mit 9 ml Ethanol (100%) bei -20°C über Nacht präzipitiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 10000 g wurde das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und anschließend in 50-100µl DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert. Der RNA-Gehalt und die Reinheit wurde photometrisch bestimmt und Zusätzlich visuell über eine Agarose-Gel überprüft.

Alle verwendeten Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt.



### 2.4.9 Northern-Hybridisierungen

Zwischen 3 und 20 µg Gesamt-RNA wurden mit RNA-Denaturierungslösung [50% (v/v) Formamid, 6,6% (v/v) Formaldehyd, 1 x SSC (150 mM NaCl; 15 mM Natriumcitrat; pH 7,0)] versetzt, 10 min bei 68°C denaturiert und dann 5 min auf Eis gekühlt. Der Transfer auf eine Hybond-N Nylon-Membran (GE Healthcare) erfolgte mittels einer Vakuum-Transferapparatur (Schleicher & Schuell), nachdem die Proben 1:3 in 20 x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat) verdünnt worden waren. Als Positivkontrolle zur Hybridisierung der DNA-Sonden mit der RNA diente ein PCR-Produkt der ersten 400 bp des *cadB*-Gens. Nach Beendigung des Transfers wurde die auf der Membran befindliche RNA durch 3-minütige Bestrahlung mit UV-Licht (304 nm) fixiert.

Die Prähybridisierung der Membran erfolgte in einem Hybridisierungssofen für 2 h bei 60°C in Hybridisierungslösung (5 x SSC (0,75 M NaCl; 75 mM Natriumcitrat); 5x Denhardt's Reagenz; 0,1% (w/v) SDS; 1 µg Lachssperma-DNA). Die [ $\alpha^{32}$ -P]-dCTP-markierte DNA-Sonde (10 ng) wurde unmittelbar vor der Verwendung für 5 min bei 95°C denaturiert und 5 min auf Eis gekühlt. Die Hybridisierung erfolgte durch Zugabe der Sonde in 10 ml Hybridisierungslösung über Nacht bei 60°C. Anschließend wurde die Membran 3 mal 20 min in jeweils 35 ml Waschlösung (2 x SSC (0,3 M NaCl; 30 mM Natriumcitrat); 0.1% (w/v) SDS) gewaschen. Danach wurde die Membran kurz auf Filterpapier getrocknet, die Exposition erfolgte für 20 h unter einem „Storage Phosphor Screen“. Die Quantifizierung der Hybridisierungssignale erfolgte mittels der Software ImageQuant (Version 5.0).

Alle verwendeten Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt.

### 2.4.10 Markierung von DNA

Die Herstellung einer DNA-Sonde zur Detektion von mRNA des *cadB*-Gens erfolgte mittels PCR. Als Template-DNA diente genomische DNA aus *E. coli* MG1655, als Senseprimer diente das Oligonukleotid CadB-*Bam*HI-Sense, als Antisenseprimer das Oligonukleotid CadB-Anti. Das 400 bp große Amplifikat wurde mittels Gelelektrophorese verifiziert und isoliert. 25 ng des Amplifikats wurden mittels des „rediprime<sup>TM</sup>II DNA Labelling Systems“ (GE Healthcare) mit 5 µl [ $\alpha^{32}$ -P]dCTP (3000 Ci/mmol) nach Vorschrift des Herstellers radioaktiv markiert. Überschüssiges [ $\alpha^{32}$ -P]dCTP wurde mit Hilfe des „Nucleotide Removal Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers entfernt.

Die Markierung der DNA-Fragmente „Cad1“, „Cad2“ und „Cad1-2“ für Gelretardationsexperimente erfolgte als 5'-Endmarkierung. Je 1 µg der Fragmente wurde mit 10 U T4-Polynukleotidkinase und 10 µCi [ $\gamma^{32}$ -P]ATP (3000Ci/mmol) 1 h bei 37°C in

Polynukleotidkinase-Puffer (50 mM Tris/HCl (pH 8.2), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0,1 mM Spermidin) inkubiert. Überschüssiges [ $\gamma^{32}$ -P]dCTP wurde mit Hilfe des „Nucleotide Removal Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers entfernt.

#### 2.4.11 P1-Phagenlysatspräparation und P1-Transduktion

Die Präparation von P1-Lysaten verschiedener *E. coli*-Stämme und die anschließende Transduktion der Phagen in *E. coli*-Stämme wurden gemäß dem Protokoll nach Leder *et al.* (1977) durchgeführt. Zur Präparation des P1-Lysates wurde 1 ml Zellkultur mit einer OD<sub>600</sub> ~ 0,1-0,5 in LB-Medium mit 10 mM CaCl<sub>2</sub> und 50  $\mu$ l P1-Phagensuspension für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 8 ml LB-Medium + 10 mM CaCl<sub>2</sub> hinzugefügt, und die Kultur für 1,5-4 h bei 37°C aerob inkubiert, bis eine totale Lyse der Zellen erfolgt war. Das Lysat wurde mit 0,2 ml Chloroform versetzt und auf Eis inkubiert bis ein Sediment zu beobachten war. Der Überstand wurde anschließend 5 min bei 4000 x g und 4°C zentrifugiert. Der das Phagenlysate enthaltende Überstand wurde erneut mit 100-200  $\mu$ l Chloroform versetzt und dann bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Zur Transduktion der Lysate wurden *E. coli*-Stämme, in die das jeweilige P1-Lysat transduziert werden sollte, in LB-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> ~ 0,3 aerob bei 37°C gezogen. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4000 x g geerntet, zweimal in Transduktionsmedium (100 mM NaCl; 5 mM CaCl<sub>2</sub>; 1 mM MgCl<sub>2</sub>) gewaschen und anschließend in Transduktionsmedium resuspendiert, so dass eine OD<sub>600</sub> von ~ 1 erhalten wurde. Danach wurden je 300  $\mu$ l der Zellsuspension mit 50  $\mu$ l P1-Phagenlysate für 30-50 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit 5 ml LB-Medium + 10 mM Natriumcitrat versetzt, und dann für 40-60 min aerob bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 4000 x g zentrifugiert, auf entsprechendem Selektiv-Nährböden ausplattiert und 1-2 Tage bei 37°C inkubiert. Die Transduktanten wurden anschließend erneut in Flüssigmedium kultiviert und entsprechend auf ihren Phänotyp getestet.

#### 2.4.12 Plasmidkonstruktion

Das Plasmid pUC19-*cadC* wurde durch Restriktion des Plasmids pET16b-*cadC* mit *NcoI* und *BamHI* und Einfügen des entstandenen Fragments *his<sub>10</sub>-cadC* in den Klonierungsvektor pUC19 konstruiert. pET16b-*cadC* kodiert für ein CadC-Derivat, das einen 10-Histidin-Tag, gefolgt von einem Linker mit 9 As am N-Terminus besitzt.

Für die Analyse von verkürzten CadC-Derivaten wurden die Plasmide pBAD24-*cadC* 1-103, pBAD24-*cadC* 1-159, pBAD24-*cadC* 1-164, pBAD24-*cadC* 1-169, pBAD24-*cadC* 1-174, pBAD24-*cadC* 1-179, pBAD24-*cadC* 1-183, pBAD24-*cadC* 1-187, pBAD24-*cadC* 1-215 bis pBAD24-*cadC* konstruiert. Dazu wurden mit dem Oligonukleotid CadC-*NdeI*-sense als Sense-

Primer, den entsprechenden Antisense-Primern (s. Tab. 2.3) und dem Plasmid pUC19-*cadC* als Template DNA-Bereiche amplifiziert und anschließend mit Hilfe der Restriktionsendonucleasen *NdeI* und *BamHI* in das Plasmid pUC19-*cadC* kloniert. Nach erfolgter Sequenzierung wurden die jeweiligen DNA-Bereiche mit *NcoI* und *XmaI* ausgeschnitten und in das Plasmid pBAD24 kloniert. Für die Analyse der CadC-Bindestellen *in vivo* wurden die Plasmide pRS415-Cad1-2, pRS415- $\Delta$ Cad1 und pRS415- $\Delta$ Cad2 konstruiert. Die *cadBA*-Promotorregion von bp -150 bis +72 („Cad1-2“) wurde mit den Oligonukleotiden Cad1-*EcoRI*-sense und Cad-*BamHI*-anti per PCR amplifiziert. Die *cadBA*-Promotorregion von bp -89 bis +72 („ $\Delta$ Cad1“) wurde mit den Oligonukleotiden Cad2-*EcoRI*-sense und Cad-*BamHI*-anti per PCR amplifiziert. Die *cadBA*-Promotorregion von bp -150 bis +72 mit einer Deletion der Cad2-Seite von bp -89 bis -59 („ $\Delta$ Cad2“) wurde durch die Ligation von drei DNA-Fragmenten konstruiert: das erste Fragment wurde mit den Oligonukleotiden Cad1-*EcoRI*-sense und Cad2-Del-*XhoI*-anti per PCR amplifiziert; das zweite Fragment wurde durch Annealing der Oligonukleotide Cad2-Replace-sense und Cad2-Replace-anti hergestellt; das dritte Fragment wurde mit den Oligonukleotiden Cad2-Del-*XbaI*-sense und Cad-*BamHI*-anti per PCR amplifiziert. Das erste Fragment wurde mit *XhoI* geschnitten, das zweite Fragment wurde mit *XhoI* und *XbaI* geschnitten und das dritte Fragment wurde mit *XbaI* geschnitten. Alle drei Fragmente wurden mit T4-Ligase miteinander ligiert, woraus das DNA-Fragment „ $\Delta$ Cad2“ resultierte. Die DNA-Fragmente „Cad1-2“, „ $\Delta$ Cad1“ und „ $\Delta$ Cad2“ wurden mit *EcoRI* und *BamHI* in das Plasmid pRS415 kloniert. Daraus resultierten die Plasmide pRS415-Cad1-2, pRS415- $\Delta$ Cad1 und pRS415- $\Delta$ Cad2. Alle PCRs wurden mit genomischer DNA des Stammes MG1655 durchgeführt.

Für Untersuchungen des Promotors des *cadBA*-Operons wurden unterschiedlich lange Bereiche dieses Promotors, die die ersten 150 bis 600 bp stromaufwärts des *cadBA*-Transkriptionsstarts umfassten, mit dem Oligonukleotid Cad-*BamHI*-anti als Antisense-Primer und den Oligonukleotiden Cad1-*EcoRI*-sense, Pcad-181, Pcad-221, Pcad-260, Pcad-290 und Pcad-600 als Sense-Primern (s. Tab. 2.3) und genomischer DNA des Stammes MG1655 als Template durch PCR amplifiziert und mit *EcoRI* und *BamHI* in das Plasmid pUC19 kloniert. Nach erfolgter Sequenzierung wurden die Promotorbereiche mit *EcoRI* und *BamHI* wieder ausgeschnitten und in den Vektor pRS551 kloniert. Daraus resultierten die Plasmide pRS551-Pcad150, pRS551-Pcad181, pRS551-Pcad221, pRS551-Pcad260, pRS551-Pcad290 und pRS551-Pcad600.

Um das *his<sub>10</sub>-cadC* Allel auf das Chromosom von MG1655 zu transferieren, wurde das Plasmid pBSK-(II)-CadC-insert konstruiert. Dazu wurde zunächst mit *XbaI*-ATG-6His als Sense-Primer, His-CadC in-anti als Antisenseprimer und pET16b-*cadC* als Template ein *cadC*-Derivat amplifiziert, welches die Sequenz für ein Startcodon, den His-Tag und die Linkerregion aus pET16b

und die ersten 500 bp von *cadC* trug; dieses DNA-Fragment wurde dann mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *EcoRI* in den Vektor pBSK-(II) kloniert, resultierend in dem Vektor pBSK-*cadC*500. Danach wurde mit *cadC*+500-sense als Senseprimer, *cadC*+500-anti als Antisenseprimer und genomischer DNA von MG1655 als Template die stromaufwärts des *cadC*-Gens gelegenen 500 bp amplifiziert und mit *PstI* und *XbaI* in pBSK-*cadC*500 kloniert. In dem resultierenden Plasmid pBSK-*cadC*+/-500 lagen die stromaufwärts von *cadC* gelegenen 500 bp vor einem Abschnitt, der für ein Startcodon, den His<sub>10</sub>-Tag und die Linkerregion codierte, und der von den ersten 500 bp von *cadC* gefolgt war. In den stromaufwärts von *cadC* gelegenen Bereich wurde mit *NcoI* eine Kanamycin-Kassette kloniert, resultierend im Plasmid pBSK-*cadC*+/-500-Kan. Anschließend wurde der gesamte Bereich mit *SceI*-*SacI*-*SacII*-*cadC* als Senseprimer und His-CadC in-anti als Antisenseprimer amplifiziert und mit *SacI* und *EcoRI* in das Plasmid pBSK-(II) kloniert, resultierend in pBSK-(II)-CadC-insert (siehe auch Abb. 6).

Für Untersuchungen der CadC-Oligomerisierung *in vivo* wurde *cadC* mit Hilfe der Oligonukleotide CadC-*SalI*-sense und CadC-*BamHI*-Stop und genomischer DNA des Stamms MG1655 amplifiziert und mit *SalI* und *BamHI* in das Plasmid pJH391 kloniert. Daraus resultierte das Plasmid pJH391-*cadC*.

Alle neukonstruierten Plasmide wurden zunächst in *E. coli* JM109 oder *E. coli* DH5a transformiert und in diesen Stämmen vermehrt.

### 2.4.13 Stammkonstruktion

Bei den *E. coli* Stämme CK1, CK2 und CK3 handelte es sich um Derivate des Stamms *E. coli* MG1655- $\Delta$ *lacZ*. Für die Konstruktion wurde der Stamm MC4100 mit den Plasmiden pRS415-Cad1-2, pRS415- $\Delta$ Cad1 oder pRS415- $\Delta$ Cad2 transformiert, in LB-Medium über Nacht kultiviert, und ein Aliquot der Zellen abzentrifugiert und in SM-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7.5; 100 mM NaCl; 10 mM MgSO<sub>4</sub>) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des Phagen  $\lambda$ RZ5 (Jones und Gunsalus, 1987) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit Top-Agar auf LB-Agarplatten ausgebracht. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C wurden etwa 20 Plaques mit Hilfe einer Pipettenspitze ausgestochen und in 500  $\mu$ l SM-Puffer resuspendiert. Mit diesem „Minilysat“ wurden Zellen MG1655- $\Delta$ *lacZ* auf die gleiche Weise behandelt und auf LB-XGal-Platten ausgebracht. Einzelne blaue Plaques wurden erneut ausgestochen, in SM-Puffer resuspendiert und wieder Zellen MG1655- $\Delta$ *lacZ* mit diesem Lysat infiziert. Die Zellen wurden auf LB-XGal-Citrat-Carb-Platten (40  $\mu$ g/ml XGal, 20 mM Na<sub>3</sub>-Citrat, 25  $\mu$ g/ml Carbenicillin) ausplattiert und blaue Kolonien auf Ampicillin-Resistenz getestet

Bei CK4 handelt es sich um MG1655, bei dem *cadC* ausgetauscht wurde gegen ein Allel, das für einen His<sub>10</sub>-Tag und eine Linkerregion, bestehend aus 9 Aminosäuren, direkt vor *CadC* kodiert, effektiv also das *CadC*-Derivat, welches auch von pET16b-*cadC* kodiert wird (siehe auch Abb. 6). Die Stammkonstruktion erfolgte nach der Methode von Blattner (Herring *et al.*, 2003). Dafür wurden pBSK-(II)-*CadC*-insert und pACBSR in MG1655 transformiert. pACBSR kodierte für die Enzyme des Lambda-Red-Rekombinasesystems und die Endonuklease I-*SceI*. Bei Induktion dieses Plasmids mit 0,2% (w/v) Arabinose wurde I-*sceI* exprimiert und das *cadC*-Insertions-Fragment aus pBSK-(II)-*CadC*-insert herausgeschnitten. Durch Rekombinationsereignisse stromaufwärts der Kanamycin-Kassette und stromabwärts der His<sub>10</sub>-Linker-Region wurde *cadC* durch *his<sub>10</sub>-cadC* ersetzt. Durch Ausplattieren auf Kanamycin-Platten erfolgte eine Selektion auf rekombinante Zellen. Durch Patchen auf Ampicillin-Platten wurde anschließend sichergestellt, dass nur Zellen ohne intaktes pBSK-(II)-*CadC*-insert selektiert wurden (nur Zellen, die auf Kanamycin-Platten, nicht aber auf Ampicillin-Platten wuchsen, waren positiv-rekombinant). Durch Präparation genomischer DNA, PCR mit den Primern ATG-6His-*XbaI* und His-*CadC* in-anti und anschließende Sequenzierung des PCR-Produkts wurde das chromosomale *his<sub>10</sub>-cadC* Allel verifiziert.

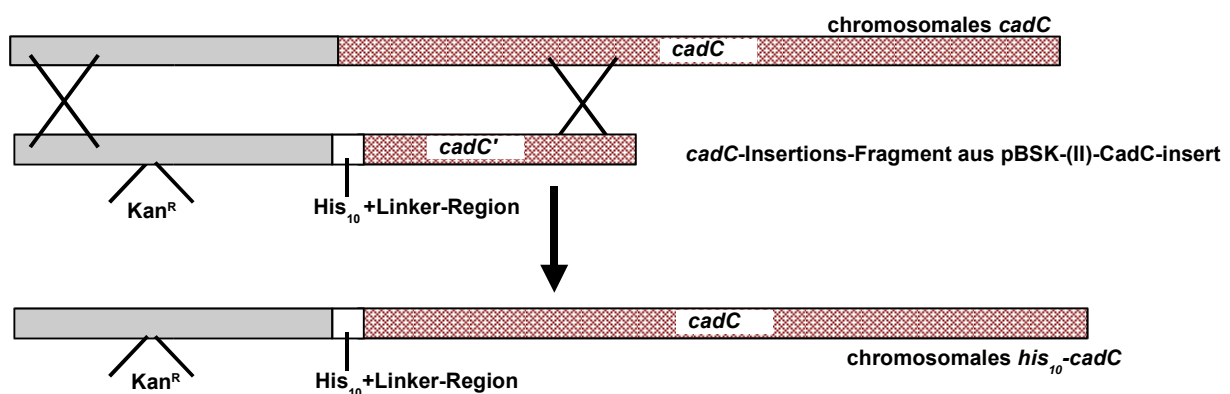


Abb. 6: Schematische Darstellung der Konstruktion von CK4

Für eine phänotypische Charakterisierung des *Cad*-Systems wurde als Wildtyp der *E. coli*-Stamm MG1655 ausgewählt, von dem die komplette Genomsequenz bekannt ist (Blattner *et al.*, 1997). Um von diesem Stamm eine Mutante mit einem nicht-funktionalen *Cad*-System herzustellen, wurde mittels einer P1-Transduktion der *cadC*-Locus durch den *cadC::kan*-Locus aus dem Stamm W3110- $\Delta cadC$  ersetzt.

#### 2.4.14 Bestimmung der Lebendzellzahl (LZZ)

Für die Bestimmung der Lebendzellzahl (LZZ) wurden von der entsprechenden Kultur serielle Verdünnungen zwischen  $10^{-1}$  und  $10^{-6}$  in steriler NaCl-Lösung [0,9% (w/v)] hergestellt, 100  $\mu$ l davon auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Kolonien auf der Platte wurden ausgezählt und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors auf die Zahl der lebenden Zellen in 1 ml der Kultur zurückgerechnet, wobei eine Kolonie-bildende Einheit als eine lebende Zelle gewertet wurde.

### 2.5 Biochemische und analytische Methoden

#### 2.5.1 Reinigung und Rekonstitution von His<sub>10</sub>-CadC und His<sub>10</sub>-CadC 1-215

Invertierte Membranvesikel wurden nach dem Protokoll von Siebers und Altendorf (1988) hergestellt. In Abwandlung zu diesem Protokoll wurde ein Aufschlusspuffer verwendet, der nicht Hepes/Tris, sondern Tris/HCl pH 7,5 und anstelle von 100  $\mu$ g/ml nur 30  $\mu$ g/ml DNase enthielt. Nicht aufgeschlossene Zellen und Zellrümpfer wurden durch einen niedertourigen Zentrifugationsschritt für 10 min bei 11.200 x g entfernt. Die invertierten Membranvesikel wurden bei 130.000 x g in einer Centrikon T-2070 Ultrazentrifuge (Kontron Instruments) pelletiert, zweimal in niederionischem Puffer (1 mM Tris/HCl, pH 7,5; 3 mM EDTA; 0,5 mM PMSF) gewaschen und anschließend in TG-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10% (v/v) Glycerol) aufgenommen. Die Lagerung der Vesikel erfolgte bei -80°C, nachdem sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren worden waren.

Membranproteine aus invertierten Membranvesikeln von *E. coli* BL21/pET-16b-*cadC* wurden in einer Endkonzentration von 4 mg/ml Protein mit 2% (v/v) LDAO in Solubilisierungspuffer (50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 0,15 M NaCl, 10% (v/v) Glycerin, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) solubilisiert. Dazu wurde eine 6,67%ige (v/v) Detergenzlösung innerhalb von 5 min schrittweise zum Solubilisierungsansatz gegeben. Insgesamt wurde 30 min unter Rühren auf Eis solubilisiert. Anschließend wurde 45 min bei 264000 x g in einer Beckman TL100-Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand enthielt die solubilisierten Proteine.

Die Reinigung des solubilisierten His<sub>10</sub>-CadC erfolgte nach dem Prinzip der Metall-Chelat-Affinitätschromatographie mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose. 400  $\mu$ l Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose wurden auf eine Durchflusssäule (Qiagen) geladen, mit 10 ml Wasser gewaschen und mit 20 ml Reinigungspuffer (10% (v/v) Glycerol, 50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,2% LDAO (v/v), 30 mM Imidazol, 600 mM NaCl) äquilibriert. Zur Bindung des gelösten Proteins wurde die Ni<sup>2+</sup>-NTA-

Agarose mit 10 ml des Solubilisats in einem 12 ml Greiner-Röhrchen vereinigt und bei 4°C für 30 min auf der Wippe inkubiert. Nach Waschen mit 40 ml Reinigungspuffer wurde mit 0,5-1 ml Elutionspuffer (Reinigungspuffer + 250 mM Imidazol) das Protein vom Säulenmaterial eluiert und die Proteinmenge mit der Amidoschwarz-Methode (Popov *et al.*, 1975) bestimmt. Von allen Schritten mit Ausnahme der Äquilibrierung wurden Proben genommen, per SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Coomassie-Blau- oder Silberfärbung die Reinigungsfortschritte dokumentiert.

Gereinigtes His<sub>10</sub>-CadC wurde gemäß der von Jung *et al.* (1997) abgewandelten Methode nach Rigaud *et al.* (1995) in Liposomen aus *E. coli*-Phospholipiden rekonstituiert. Bei dieser detergentenvermittelten Rekonstitution wurden die Liposomen durch Zugabe des Detergenz Triton X-100 [0,47% (v/v)] partiell solubilisiert. Anschließend wurde gereinigtes Protein in 0,2% (v/v) LDAO in einem Lipid:Protein-Verhältnis von 25:1 zugegeben. Der Ansatz wurde für 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe von BioBeads, um die Detergentien zu entfernen. Die BioBeads wurden in einem BioBeads:Detergenz-Verhältnis von 5:1 zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde noch einmal die gleiche Menge BioBeads zugegeben und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden erneut BioBeads in einem BioBeads:Detergenz-Verhältnis von 10:1 zugegeben und über Nacht bei 4°C gerührt. Der Überstand wurde abgenommen und 1,5 h bei 372000 x g in einer Beckmann TL-100-Ultrazentrifuge zentrifugiert, das Pellet in 1 ml TG-Puffer (50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 10% (v/v) Glycerol) resuspendiert, die Proteinmenge nach Popov (1975) bestimmt und das rekonstituierte Protein in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die Reinigung und Rekonstitution von His<sub>10</sub>-CadC 1-215 aus Membranvesikeln BL21/pET16b-*cadC* 1-215 erfolgte wie die von His<sub>10</sub>-CadC mit folgenden Abweichungen: Die NaCl-Konzentration im Reinigungs- und Elutionspuffer betrug 200 mM, die Imidazolkonzentration im Reinigungspuffer 10 mM.

### 2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970). Dazu wurden 0,75 mm dicke Flachgele der Größe 10x10 cm oder 16x20 cm verwendet. Die Acrylamidkonzentration betrug im Sammelgel 4,9%, im Trenngel 7,5-12,5%. Die Gele wurden mit Hilfe von Protogel-Fertiglösung (30% (w/v) Acrylamid; 0,8% (w/v) Bisacrylamid) (Biozym Diagnostik GmbH) hergestellt. Die Proben wurden vor dem Lauf mit SDS-Probenpuffer versetzt, so dass eine Endkonzentration von 62,5 mM Tris/HCl (pH 6,8), 10% (v/v) Glycerol, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol und 0,005% (w/v) Bromphenolblau erzielt wurde. Als Standard wurde „Precision Plus“ (Bio Rad) „High

Molecular Weight“ oder „Prestained-High Molecular Weight“ (Sigma) verwendet. Der Gellauf wurde in einer Mini-Protean-Laufanlage (Biorad) für Minigele bei konstant 200 V bzw. in einer SE400-Elektrophoresekammer (Hoefler) für große Gele bei konstant 60 V durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend mit Serva Blau G-250 (Coomassie-Blau) nach Weber und Osborn (1969) detektiert, wobei die Färbelösung zur Fixierung der Proteine zusätzlich 10 % (w/v) TCA enthielt. Die Entfärbung der Gele erfolgte in 5% (v/v) Methanol und 7,5% (v/v) Essigsäure. Alternativ wurde eine sensitivere Detektion der Proteine mittels Silberfärbung (Blum *et al.* 1987) erzielt.

### 2.5.3 Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen wurde in Abwandlung des Protokolls von Lowry *et al.* (1951) nach Peterson *et al.* (1977) durchgeführt. Als Standardprotein für die Erstellung von Eichgeraden wurde BSA (Qiagen) verwendet.

Alternativ wurden auch Proteinbestimmungen nach Bradford (Bradford und Williams, 1976) oder Popov (Popov *et al.*, 1975) durchgeführt.

### 2.5.4 Immunoblot

Die durch eine SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels einer Nassblot-Apparatur (Peqlab) durch horizontale Elektrophorese für 90 min bei 350 mA, oder über Nacht bei 100 mA vom Gel auf Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell; Porendurchmesser 0,45  $\mu\text{m}$ ) transferiert (Westernblot). Dafür wurden die Membran, das Filterpapier und das Gel vorher kurz in Blotpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol) inkubiert. Nach dem Blot wurde die Nitrozellulose für eine Stunde in TBS-Puffer [0,9% (w/v) NaCl, 50 mM Tris/HCl (pH 7,4)] + 3% (w/v) BSA (Biomol) zur Absättigung unspezifischer Bindungen inkubiert. Als erster Antikörper wurde ein Penta-His-Antikörper in einer Endkonzentration von 1:1000 bis 1:10000, oder ein  $\alpha$ -CadC-Antiserum (1:1000) zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur in TBS + 3% (w/v) BSA inkubiert. Als zweiter Antikörper wurde ein mit alkalischer Phosphatase oder mit Peroxidase konjugierter Anti-Mouse-IgG Antikörper in einer Endkonzentration von 1:2500 bis 1:10000 zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur in TBS + 3% BSA inkubiert. Für den mit alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörper wurde der Immunoblot durch Zugabe einer Färbesubstratlösung (50 mM Natriumcarbonatpuffer (pH 9,5), 0,01% (w/v) Nitro-Blue-Tetrazolium, 0,045% (w/v) 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat) entwickelt. Die Entwicklung des Immunoblots für den mit Peroxidase konjugierten Antikörper erfolgte durch Zugabe einer Super Signal-Entwicklerlösung (Pierce) und anschließender Exposition für etwa 60 Sekunden auf „Hyperfilm



ECL“ (GE Healthcare).

### 2.5.5 DNaseI-Schutzexperimente

Zur Bestimmung des DNA-Bindemotivs von CadC im regulatorischen Bereich des *cadBA*-Operons, wurden DNaseI-Schutzexperimente in Anlehnung an die Methode von Sandaltzopoulos (Sandaltzopoulos *et al.*, 1994) durchgeführt. Dazu wurde zunächst der stromaufwärts vom *cadBA*-Operon liegende, 300 bp umfassende Bereich der DNA mittels PCR amplifiziert, wobei der „Sense-Primer“ am 5'-Ende mit dem 5'-Isomer des Fluorescein-Moleküls („5-Fam“) markiert war. Die DNA wurde mit gereinigtem His<sub>10</sub>-CadC in Protein : DNA-Verhältnissen von 1:1, 2:1, 15:1 und 50:1 in einem Reaktionsvolumen von 20 µl für 10 min bei 30°C inkubiert und anschließend mit 10 mU DNaseI versetzt. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne His<sub>10</sub>-CadC. Die Reaktion wurde nach 30, 60 oder 120 sec. abgestoppt, indem EDTA in einer Endkonzentration von 10 mM zu den Ansätzen gegeben wurde. Die DNA wurde durch Zugabe von 180 µl 100% Ethanol für 2 h bei -20°C gefällt und durch 15-minütige Zentrifugation bei 16100 x g sedimentiert. Nach einem Waschschritt mit 500 µl 70% (v/v) Ethanol wurden die Ansätze mittels eines Applied Biosystems Modell 377 DNA-Sequencer analysiert.

### 2.5.6 DNA-Bindeexperimente

Gel-Retardations-Experimente wurden in Anlehnung an das Protokoll von Fried und Crothers (1981) durchgeführt. Die drei DNA-Fragmente „Cad1“ (bp -150 bis -112 des stromaufwärts des *cadBA*-Transkriptionsstarts gelegenen DNA-Bereichs) „Cad2“ (bp -89 bis -59) und „Cad1-2“ (bp -150 bis -59) wurden durch Annealing der Oligonukleotide Cad5-sense und Cad5-antisense („Cad1“), Cad6-sense und Cad6-antisense („Cad2“) und durch PCR mit den Oligonukleotiden Cad5-sense und Cad6-antisense als Primern und genomischer DNA von *E. coli* MG1655 als Matrize („Cad1-2“) hergestellt.

Die Markierung der DNA-Fragmente am 5'-Ende erfolgte wie unter 2.4.10 beschrieben. DNA-Fragmente in einer Endkonzentration von 15 nM wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1-3 µM) des gereinigten und rekonstituierten CadC in DNA-Bindepuffer (50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerol (v/v), 1 mM DTT) in einem Gesamtvolumen von 20 µl inkubiert. Lysin wurde in einer Endkonzentration von 10 mM, Cadaverin in einer Endkonzentration von 2 mM zu den Ansätzen gegeben. Durch 10-maliges Extrudieren durch einen 50 nm Carbonatfilter sollte sichergestellt werden, dass die Pufferkomponenten auch ins Innere der Proteoliposomen gelangten. Als unspezifische Kompetitor-DNA wurde 1 µl Lachssperma-DNA [1mg/ml] zugegeben. Die Inkubation erfolgte 10 min bei 37°C. Vor dem Gellauf wurden 3 µl

„Sucrose-Dye-Solution“ (50% (w/v) Saccharose, 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol) zu den Proben gegeben. Die Auftrennung von ungebundener DNA und DNA-Protein-Komplexen erfolgte in einem 5%igem PAA-Gel (37,5:1 Acrylamid:Bisacrylamid). Der Gellauf erfolgte für 3 h bei konstant 110 V mit 0,5-fach TBE-Puffer als Laufpuffer. Anschließend wurde das Gel 1,5 h bei 80°C unter Vakuum getrocknet. Die Exposition erfolgte für 2 h im Phosphoscreen.

Für Gel-Retardationsexperimente mit Zytoplasma- oder Membranfraktionen wurden je 0,1 µg, 1 µg oder 10 µg der entsprechenden Fraktion mit einem radioaktiv markierten DNA-Fragment mit der Sequenz bp -150 bis +72 der *cadBA*-Promotorregion in einer Endkonzentration von 15 nM in DNA-Bindepuffer gemischt. Als unspezifische Kompetitor-DNA wurde 1 µl Lachssperma-DNA [1mg/ml] zugegeben. Die Inkubation erfolgte 10 min bei 37°C. Vor dem Gellauf wurden 3 µl „Sucrose-Dye-Solution“ (50% (w/v) Saccharose, 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol) zu den Proben gegeben. Die Auftrennung von ungebundener DNA und DNA-Protein-Komplexen erfolgte in einem 5%igem PAA-Gel (37,5:1 Acrylamid:Bisacrylamid). Der Gellauf erfolgte für 3 h bei konstant 110 V mit 0,5-fach TBE-Puffer als Laufpuffer. Anschließend wurde das Gel 1,5 h bei 80°C unter Vakuum getrocknet. Die Exposition erfolgte für 2 h im Phosphoscreen.

Die Bindung von CadC an DNA bei unterschiedlichen pH-Werten wurde mit Hilfe von Filter-Binde-Assays untersucht. DNA-Fragmente in einer Endkonzentration von 15 nM wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1-3 µM) des gereinigten und rekonstituierten CadC in DNA-Bindepuffer pH 7,5 (50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% (v/v) Glycerol, 1 mM DTT) oder DNA-Bindepuffer pH 5,8 (50 mM MES (pH 5,8), 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% (v/v) Glycerol, 1 mM DTT) in einem Gesamtvolumen von 20 µl inkubiert. Lysin wurde in einer Endkonzentration von 10 mM, Cadaverin in einer Endkonzentration von 2 mM zu den Ansätzen gegeben. Durch 10-maliges Extrudieren durch einen 50 nm Carbonatfilter sollte sichergestellt werden, dass die Pufferkomponenten auch ins Innere der Proteoliposomen gelangten. Als unspezifische Kompetitor-DNA wurde 1 µl Lachssperma-DNA [1mg/ml] zugegeben. Die Inkubation erfolgte 10 min bei 37°C. Anschließend wurden die Ansätze auf Nitrozellulosefilter (0,22 µm; Schleicher&Schuell) aufgetragen, mittels einer Vakuumapparatur durchgefilitert und die Filter mit 1 ml des entsprechenden DNA-Bindepuffers gewaschen. Dabei verblieben DNA-Protein-Komplexe auf dem Filter. Die Quantifizierung der gebundenen DNA auf dem Filter wurde anschließend durch Messung der Cerenkov-Strahlung in einem β-Counter (Packard) durchgeführt.

### 2.5.7 Lokalisationsstudien

Um die Lokalisation verkürzter CadC-Derivate zu bestimmen, wurden Zellen des *E. coli*-Stamms LMG194 mit den entsprechenden Plasmiden (s. Tab. 2.2) transformiert und in Gegenwart von 0.2%

(w/v) Arabinose wie unter 2.3.5 beschrieben kultiviert. Die Zellen wurden durch 10 minütige Zentrifugation bei 10000 g geerntet und in einem Aufschlusspuffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 10% (v/v) Glycerol, 0,1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 30 µg/ml DNase) resuspendiert. Die Zellen wurden durch Beschallung mit einem Branson-Sonifier Modell 250 aufgebrochen und größere Zelltrümmer und nicht-aufgeschlossene Zellen durch 10 minütige Zentrifugation bei 10000 x g entfernt. Durch eine anschließende 1-stündige Ultrazentrifugation bei 264000 x g wurde die Membranfraktionen von der zytoplasmatischen Fraktionen getrennt. Die Membranfraktionen wurden in einer äquivalenten Menge TG-Puffer resuspendiert und anschließend gleiche Volumina Membranen und Zytoplasma über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Lokalisation der CadC-Derivate wurde dann per Immunoblot wie unter 2.5.4 beschrieben bestimmt.

Für die Untersuchung der Lokalisation von chromosomal kodiertem His<sub>10</sub>-CadC im Stamm CK4, wurde CK4 zunächst wie unter 2.3.5 beschrieben kultiviert und wie oben beschrieben die Membranfraktionen und die zytoplasmatische Fraktion präpariert. Membranvesikel von CK4 wurden wie unter 2.5.1 beschrieben solubilisiert. In einem typischen Experiment wurden 1 ml solubilisierte Membranproteine (Proteinkonzentration 1 mg/ml) oder 1 ml Zytoplasma (Proteinkonzentration 1 mg/ml) von CK4 wie unter 2.5.1 beschrieben mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose inkubiert und gebundene Proteine mit 50 µl Elutionspuffer (siehe 2.5.1) eluiert. Die Eluate wurden per SDS-PAGE wie unter 2.5.2 beschrieben aufgetrennt und die Lokalisation von His<sub>10</sub>-CadC per Immunoblot wie unter 2.5.4 beschrieben untersucht.

### 2.5.8 β-Galaktosidase-Aktivitätsbestimmung

β-Galaktosidase-Aktivitäten wurden nach dem Protokoll von Miller bestimmt (Miller, 1972). Für den Test wurde je 1 ml Zellkultur bei 10000 x g abzentrifugiert und in 1 ml Phosphatpuffer (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 39 mM β-Mercaptoethanol) resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte durch Zugabe von 100 µl Chloroform und 50 µl SDS [0,1% (w/v)]. Zur Bestimmung der Aktivität wurden 200 µl ortho-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid (4 mg/ml) zu den Proben gegeben. Die Reaktion wurde nach 1-5 min durch Zugabe von 0,5 ml Natriumcarbonat (1 M) abgestoppt. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 16100 x g für 5 min entfernt. Die Intensität der durch die Reaktion hervorgerufenen Färbung wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 420 nm bestimmt. Die Aktivität wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\text{Aktivität (Miller Units)} = \frac{A_{420} * 1000}{t * V * OD_{600}}$$

Dabei ist  $A_{420}$  als die Absorption der Reaktionslösung,  $OD_{600}$  als die OD der Zellsuspension,  $t$  als die Reaktionszeit [min] und  $V$  als das Volumen der Zellsuspension [ml] definiert.

### 2.5.9 Lysin-Decarboxylase-Aktivitätsbestimmung

Die Bestimmung der Lysin-Decarboxylase-Aktivität erfolgte wie bei Lemmonier *et al.* (1997) beschrieben. In einem typischen Experiment wurden Zellen aus 10 ml Zellsuspension durch 5-minütige Zentrifugation bei 5000 x g sedimentiert und in 1 ml Aufschlusspuffer (10 mM Na-Acetat pH 6, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM EDTA, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,1 mM PLP) resuspendiert und in Gegenwart von 10  $\mu$ g/ml Lysozym 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend durch Ultraschallbehandlung mit einem Modell 250 der Firma Branson aufgeschlossen und Zelltrümmer durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 16100 x g entfernt. Der Proteingehalt des zellfreien Extrakts wurde mittels eines Bradford-Assays bestimmt. Für die Aktivitätsbestimmung wurden zwischen 2,5 und 10  $\mu$ g Protein des Zellextrakts zu 50  $\mu$ l LDC-Puffer (16 mM K-Phosphat pH 5,8; 10 mM Lysin; 0,1 mM PLP) gegeben und der Ansatz für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 120  $\mu$ l  $Na_2CO_3$  [1M] abgestoppt und entstandenes Cadaverin und noch vorhandenes Lysin durch die Zugabe von 120  $\mu$ l TNBS [10mM] für 4 Minuten bei 40°C derivatisiert. TNBS-Cadaverin wurde mit 1 ml Toluol extrahiert und die Absorption der organischen Phase bei 340 nm photometrisch bestimmt. Anhand einer TNBS-Cadaverin-Eichgerade konnte die TNBS-Cadaverin-Konzentration in der Probe bestimmt und daraus die Lysin-Decarboxylase-Aktivität errechnet werden:

$$\text{Aktivität (Units)} = \frac{\text{Cadaverin [nmol]}}{t}$$

wobei  $t$  die Reaktionszeit [min] ist. Die spezifische Aktivität wurde definiert als:

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{\text{Units}}{\mu\text{g Protein}}$$

### 2.5.10 Bestimmung der extrazellulären Lysin- und Cadaverin-Konzentration

Die extrazelluläre Cadaverin-Konzentration wurde durch HPLC-Analyse oder durch direkte photometrische Bestimmung nach Derivatisierung mit TNBS bestimmt.

Die photometrische Bestimmung beruht auf der Methode nach Phan *et. al* (1982). Dafür wurden 50 µl Medium mit 120 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> [1M] und 120 µl TNBS [10 mM] versetzt und für 4 Minuten bei 40°C inkubiert. TNBS-Cadaverin wurde mit 1 ml Toluol extrahiert und die Absorption der organischen Phase bei 340 nm photometrisch bestimmt. Die Konzentration wurde anhand einer TNBS-Cadaverin-Eichgerade ermittelt.

Für die Analyse von Polyaminen im Medium mittels HPLC wurden 100 µl des zellfreien Kulturüberstandes mit 100 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 M, pH 9,5) und 100 µl Dansylchlorid (20mg/ml in Aceton) versetzt. Die Dansylierung der Amine erfolgte bei 65°C im Dunkeln für 40 min. Überschüssiges Dansylchlorid wurde anschließend durch Zugabe von 100 µl Prolin (50 mg/ml) entfernt und das Aceton bei 65°C für 60-90 min im Dunkeln abgedampft. Die dansylierten Polyamine wurden anschließend mit 400 µl Toluol extrahiert. Die Auftrennung der Polyamine in der organischen Phase erfolgte mittels Reversed-Phase Chromatographie. Als stationäre Phase diente eine Nucleosil 100-5 C18 Säule (250\*4,6 mm). Die Elution erfolgte mit einem Methanol/Wasser-Gemisch mit folgendem Laufmittelgradienten:

0 min	75% (v/v) Methanol
10 min	80% (v/v) Methanol
12 min	95% (v/v) Methanol
17 min	100% Methanol
24 min	Ende

Für die gleichzeitige Analyse von Polyaminen und Aminosäuren im Medium mittels HPLC wurden 100 µl des zellfreien Kulturüberstandes mit 100 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 M, pH 9,5) und 100 µl Dansylchlorid (20 mg/ml in Aceton) versetzt. Die Dansylierung der Amine erfolgte bei 65°C im Dunkeln für 60 min. Überschüssiges Dansylchlorid wurde anschließend durch Reaktion mit 100 µl Prolin (50 mg/ml) entfernt und das Aceton bei 65°C für 60-90 min im Dunkeln abgedampft. Die Proben wurden anschließend mit 400 µl Toluol versetzt. Von der Toluol-Phase, die die Dansyl-Polyamine enthielt, wurden 200 µl in ein neues Gefäß überführt, in der SpeedVac eingetrocknet und in 730 µl Methanol wieder gelöst. Von der wässrigen Phase, die die Dansyl-Aminosäuren enthielt, wurden 135 µl abgenommen, mit 135 µl Essigsäure (2,9 M) versetzt und mit den Dansyl-Polyaminen wiedervereinigt. Die Auftrennung der Proben erfolgte mittels Reversed-Phase Chromatographie

über einer Nucleosil 100-5 C18 Säule (250\*4,6 mm). Die Elution erfolgte mit den Lösungen A (100% Acetonitril), B (25 mM Na-Acetat (pH 5,94); 3% (v/v) Propanol; 10% (v/v) Acetonitril) und C (10% (v/v) Acetonitril) mit folgendem Laufmittelgradienten:

0 min	B = 100%
50 min	A = 40%
	B = 60%
70 min	A = 100%
72,75 min	A = 100%
75,75 min	C = 100%
83,25 min	B = 100%
85 min	Ende

Die Auftrennung erfolgte über eine HPLC-Apparatur der Firma Dionex.

### 2.5.11 Quervernetzungsstudien

Für Quervernetzungsstudien wurde gereinigtes und rekonstituiertes His<sub>10</sub>-CadC bzw. His<sub>10</sub>-CadC 1-215 oder Membranvesikeln von *E. coli* BL21/pE16b-cadC bzw. *E. coli* BL21/pE16b-cadC 1-215 zunächst mit 1 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP; Sigma) für 15 min bei RT behandelt, um Disulfide zu reduzieren. Eine Quervernetzung von Cysteinresten in His<sub>10</sub>-CadC bzw. in His<sub>10</sub>-CadC 1-215 fand durch Bis-maleimidohexan (BMH; Pierce) in einer Endkonzentration von 2 mM bei 25°C statt. Die Reaktion erfolgte für 1 h in 100 mM K-Phosphatpuffer bei pH-Werten zwischen 5,8 und 7,6 und wurde durch Zugabe von 10 mM DTT abgestoppt. Die Proteine wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran übertragen und durch Anfärbung mit Ponceau-Rot S [0,2% (w/v)] sichtbar gemacht und wie unter 2.5.4 beschrieben immunologisch nachgewiesen. Für die Quervernetzung von gereinigten und rekonstituierten Proteinen wurden jeweils ca. 2 µg verwendet, für Quervernetzungen in Membranvesikeln wurden jeweils ca. 40 µg Protein eingesetzt.

### 2.5.12 Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen His<sub>10</sub>-CadC

Mit solubilisiertem und gereinigtem Protein wurde eine SDS-PAGE (siehe 2.5.2) durchgeführt und die Proteinbande anschließend im Gel mittels Coomassie Blau Färbung sichtbar gemacht. Die Bande für His<sub>10</sub>-CadC (insgesamt 0,2 mg Protein) wurde aus dem Gel ausgeschnitten und der Firma Eurogentec (Herstal, Belgien) zugesandt, die die Immunisierung von Mäusen vornahm.

Um die Spezifität des Antiserum zu erhöhen wurde eine Präadsorption mit zytoplasmatischen

Extrakten aus *E. coli* EP314 ( $\Delta cadC$ ) vorgenommen. Dafür wurde 10 mg Protein aus zytoplasmatischen Extrakten an 0,2 g Zyanid-Bromid aktivierte Sepharose 4B (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers gebunden. Die so präparierte Sepharose wurde mit Immunsersum für 2 h bei 4°C inkubiert. Nach Sedimentation der Sepharose wurde der Überstand abgenommen und als Antiserum für Immunoblots verwendet.

## 2.6 Biophysikalische Methoden

### 2.6.1 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die Identifizierung von C-terminal verkürzten Peptiden von gereinigtem His<sub>10</sub>-CadC erfolgte mittels MALDI-TOF-MS als Auftragsarbeit durch die Firma Esplora (Darmstadt).

Mit solubilisiertem und gereinigtem Protein (siehe 2.5.1) wurde eine SDS-PAGE (siehe 2.5.2) durchgeführt und die Proteinbande anschließend im Gel mittels Coomassie Blau Färbung sichtbar gemacht. Die zu identifizierende Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und der Firma Esplora zugesandt, die die Trypsinierung und massenspektrometrische Analyse vornahm.

Für die Molekulargewichtsbestimmung von C-terminal verkürzten Peptiden von gereinigtem His<sub>10</sub>-CadC wurde His<sub>10</sub>-CadC wie unter 2.5.1 beschrieben solubilisiert und gereinigt, allerdings wurde als Detergenz im Reinigungs- und Elutionspuffer statt 0,2% (v/v) LDAO 0,04% (w/v) Dodecylmaltosid verwendet.

## 2.7 Mathematische Modellierung des Cad-Systems

Sämtliche Gleichungen des mathematischen Modells des Cad-Systems wurden von Prof. Dr. Eduardo Mendoza, Dr. Ulrich Gerland, Akos Dobay und Georg Fritz vom Department für Physik der LMU München erstellt und sind im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung der Bindung von CadC an den P<sub>Cad</sub>-Promotor

Bereits in früheren Experimenten konnten Meng und Bennett (1992) den Bereich von bp -150 bis -48 stromaufwärts des Transkriptionsstarts des *cadBA*-Operons als relevant für die CadC-vermittelte *cadBA*-Expression identifizieren. Um ein besseres Verständnis der CadC-DNA Interaktion zu erlangen, sollten die Bindestellen von CadC auf dem *cadBA*-Promotor genauer bestimmt und die Bindung von gereinigtem CadC an diese DNA-Bereiche *in vitro* und *in vivo* untersucht werden.

##### 3.1.1 DNaseI-Schutzexperimente

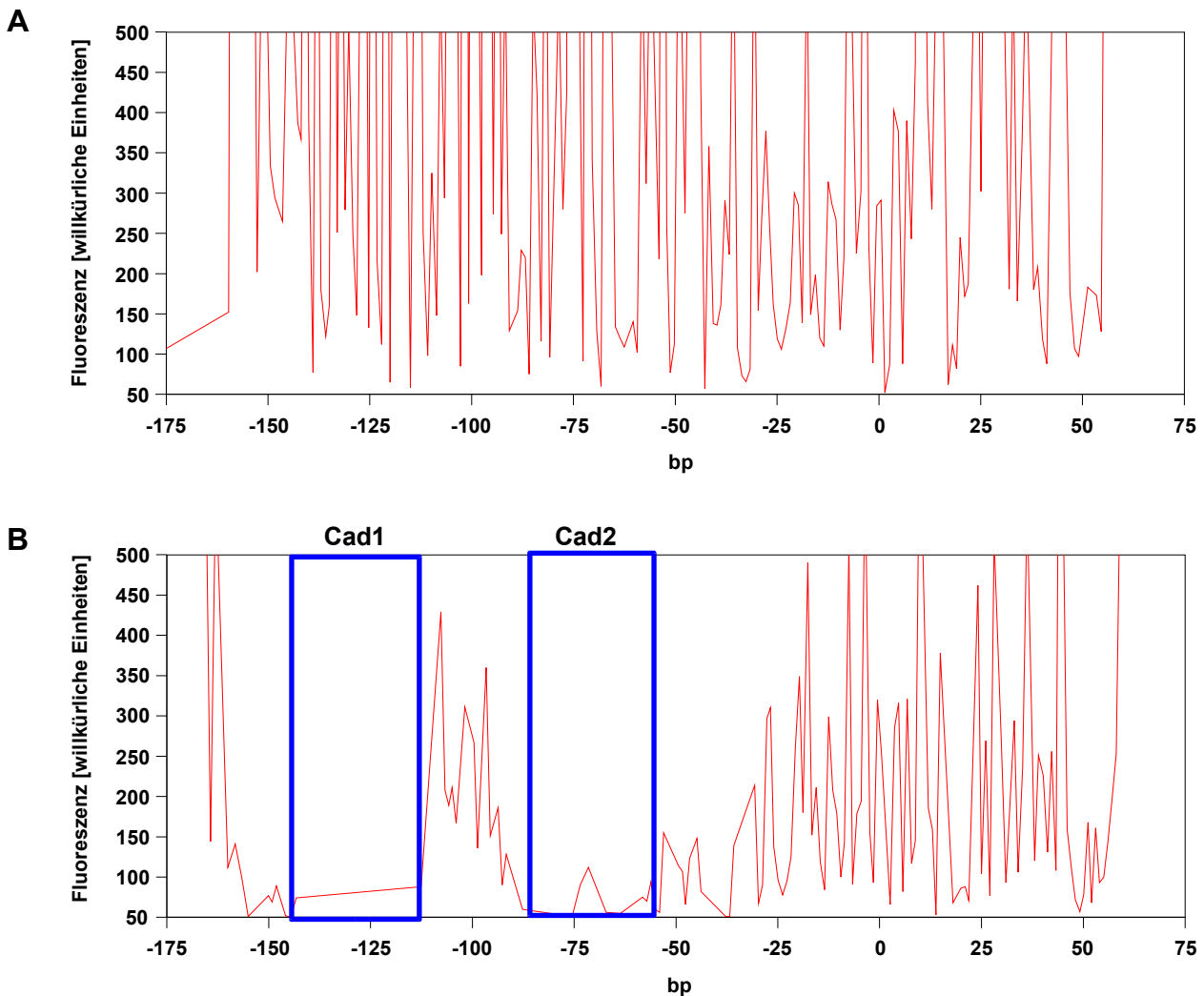
Zur Bestimmung des DNA-Bindemotivs von CadC im regulatorischen Bereich des *cadBA*-Operons, wurden DNaseI-Schutzexperimente durchgeführt. Dazu wurde zunächst der stromaufwärts vom *cadBA*-Operon liegende Bereich der DNA mittels PCR amplifiziert, wobei der „Sense-Primer“ am 5'-Ende mit dem 5'-Isomer des Fluorescein-Moleküls („5-Fam“) markiert war. Der Vorteil dieser Fluoreszenz-gestützten Methode im Vergleich zur „klassischen“ DNA-Markierung mit radioaktiven Phosphat-Gruppen ist, neben der Vermeidung des Arbeitens mit radioaktivem Material, die Möglichkeit, die entstehenden DNA-Fragmente hinsichtlich ihrer Größe auf DNA-Sequenzier-Automaten, in diesem Falle einem Modell 377 von Applied Biosystems, zu analysieren, und so die Sequenzierreaktionen, die sonst zur Zuordnung der DNA-Banden notwendigerweise mitlaufen müssen, und die aufwendige Handhabung von Sequenziergelen, zu vermeiden.

Fluoreszenz-markierte DNA und gereinigtes und rekonstituiertes His<sub>10</sub>-CadC wurden in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander gemischt und die DNA durch Zugabe von DNaseI verdaut. Bei einem Protein:DNA-Verhältnis von 50:1 konnten zwei Bereiche auf der DNA, die durch His<sub>10</sub>-CadC geschützt und als Cad1 und Cad2 bezeichnet wurden (Abb. 7), deutlich detektiert werden.

Cad1 wurde im Bereich von bp -144 bis bp -112, relativ zum Transkriptionsstart des *cadBA*-Operons, maximal vor dem DNase-Verdau geschützt, doch auch Bereiche weiter stromaufwärts bis bp -155 wurden im Vergleich zur Kontrolle verstärkt geschützt.

Für Cad2 erstreckte sich der am stärksten vor dem DNaseI-Verdau geschützte Bereich von bp -89 bis bp -59, allerdings wurde auch die Sequenz stromabwärts bis bp -30 im Vergleich zur Kontrolle verstärkt geschützt.





**Abb. 7: Footprint-Analyse der *cadBA*-Promotorregion**

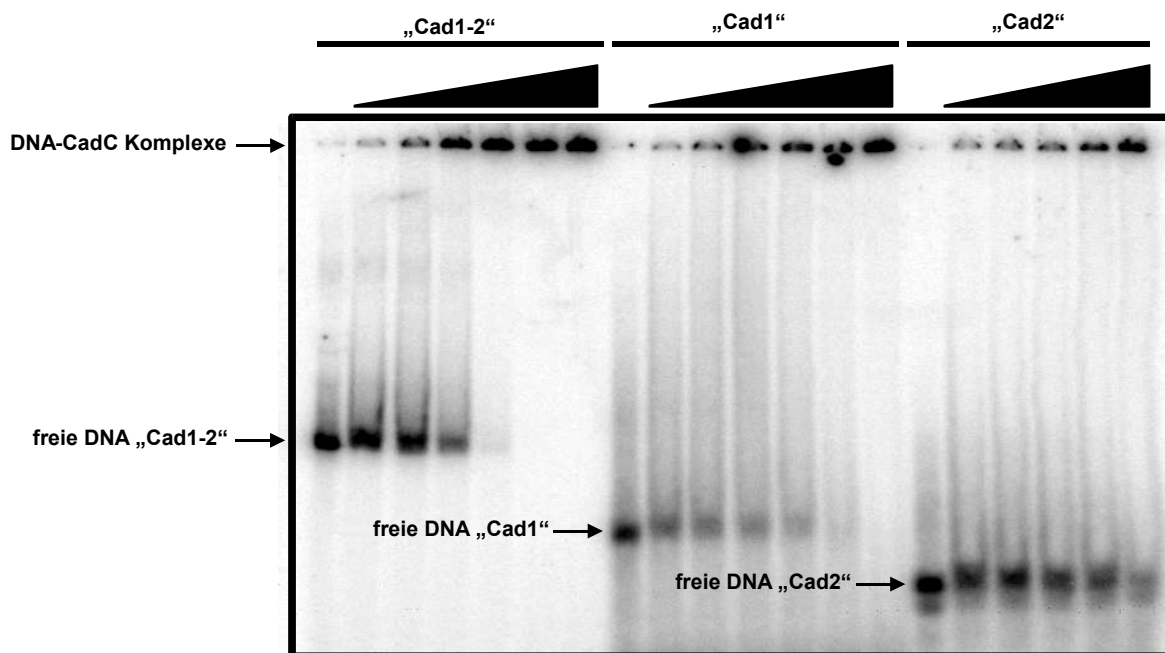
Ein DNA-Fragment mit der Sequenz des regulatorischen Bereichs des *cadBA*-Operons, das am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein markiert war, wurde ohne (A) oder mit gereinigtem und rekonstituiertem His<sub>10</sub>-CadC (B) inkubiert und anschließend ein einminütiger Nukleaseverdaul mit DNaseI durchgeführt. Die entstandenen Fragmente wurden auf einem ABI 377-Sequencer der Größe nach aufgetrennt. Blau markiert sind zwei geschützte Bereiche mit signifikant verringerter Fluoreszenzintensität, Cad1 und Cad2.

### 3.1.2 DNA-Bindeexperimente

Die genauere Charakterisierung der Bindung von CadC an die beiden potentiellen Bindestellen Cad1 und Cad2 sollte durch DNA-Bindeexperimente erfolgen. Dafür wurden mit gereinigtem, rekonstituiertem CadC in verschiedenen Konzentrationen und den DNA Fragmenten „Cad1-2“ (umfasste die Sequenz von bp -150 bis -59 der *cadBA*-Promotorregion), „Cad1“ (bp -150 bis -112) und „Cad2“ (bp -89 bis -59) Gel-Retardationsexperimente durchgeführt.

Alle drei DNA-Fragmente konnten durch CadC gebunden werden (Abb. 8). Bei der genaueren Analyse zeigte sich, dass die Fragmente „Cad1“ (welches auch der Bindestelle Cad1 entsprach) und „Cad1-2“ durch CadC stärker gebunden wurden als das Fragment „Cad2“.

Die Versuche wurden auch in Gegenwart von Lysin, dem Co-Induktor der *cadBA*-Expression *in vivo*, und Cadaverin, dem Inhibitor der *cadBA*-Expression *in vivo*, durchgeführt. In beiden Fällen konnte jedoch keine signifikant veränderte DNA-Bindung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der Pufferung des Gelsystems bei pH 7,5 konnte die Bindung von CadC an die DNA bei niedrigeren pH-Werten mit Gel-Retardationsexperimenten nicht getestet werden, daher wurden zusätzlich auch Filter-Binde-Assays durchgeführt. Die Versuche wurden bei pH 7,5 und pH 5,8 durchgeführt, es konnte aber keine erhöhte Affinität von CadC zur DNA bei pH 5,8 gemessen werden (Daten nicht gezeigt).



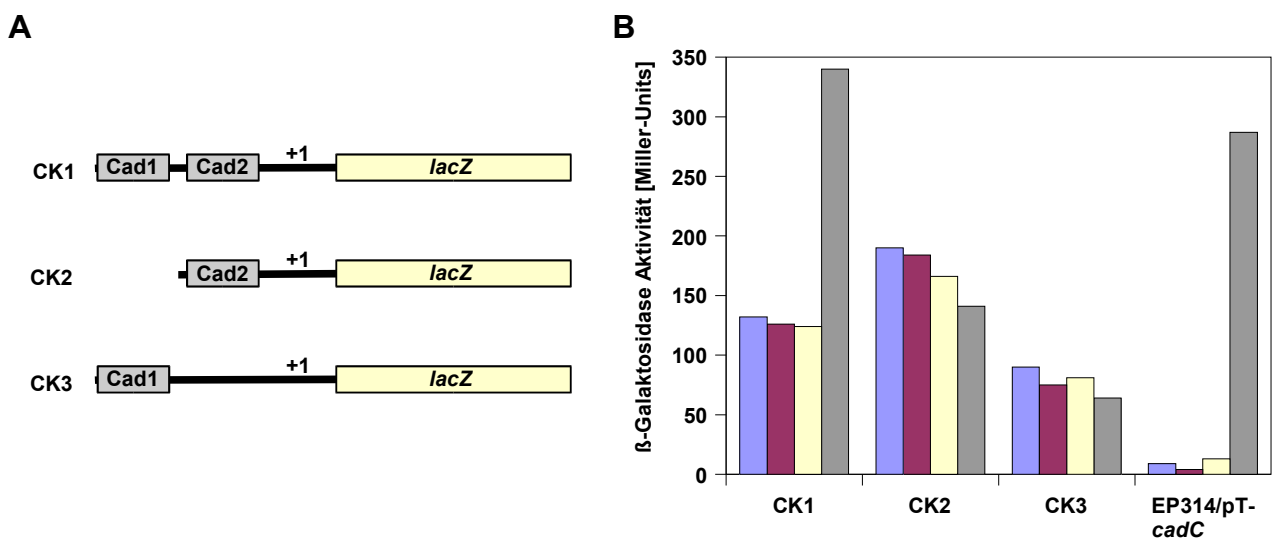
**Abb. 8: Bindung von His<sub>10</sub>-CadC an die CadC-Bindestellen *in vitro***

Radioaktiv markierte DNA-Fragmente „Cad1-2“ (entspricht der Sequenz der *cadBA*-Promotorregion von bp -150 bis -59), „Cad1“ (bp -150 bis -112) und „Cad2“ (bp -89 bis -59) wurden mit gereinigtem und rekonstituierten His<sub>10</sub>-CadC in steigenden Konzentrationen zwischen 0 und 3  $\mu$ M wie durch die schwarzen Dreiecke angedeutet inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte auf einem 5%igen PAA-Gel. Freie DNA-Fragmente konnten bei den Experimenten in das Gel einlaufen, DNA-CadC-Komplexe verblieben in den Taschen des Gels.

### 3.1.3 Bedeutung der CadC-Bindestellen *in vivo*

In den DNA-Bindeexperimenten konnte die Bindung von CadC an die beiden Bindestellen Cad1 und Cad2 nachgewiesen werden. Da in den *in vitro* Experimenten kein signifikanter Einfluss von Lysin oder der H<sup>+</sup>-Ionen Konzentration auf die DNA-Bindung gemessen werden konnte, wurde der Einfluss der Bindestellen Cad1 und Cad2 auf die *cadBA*-Expression auch *in vivo* in Abhängigkeit von Lysin und dem pH-Wert untersucht.

Dazu wurden die *E. coli*-Stämme CK1, CK2 und CK3 konstruiert. In CK1 war der DNA-Bereich von bp -150 bis +72 der *cadBA*-Promotorregion, der beide Bindestellen Cad1 und Cad2 enthielt, mit einer promotorlosen Kopie des *lacZ*-Gens fusioniert. In CK2 war der DNA-Bereich von bp -89 bis +72 der *cadBA*-Promotorregion, der nur die Bindestelle Cad2 enthielt, mit *lacZ* fusioniert. In CK3 war der DNA-Bereich von bp -150 bis +72 der *cadBA*-Promotorregion mit *lacZ* fusioniert, wobei die Sequenz der Bindestelle Cad2 durch eine zufällige DNA-Sequenz ersetzt war. Durch die Promotor-*lacZ*-Fusionen in den Stämmen CK1, CK2 und CK3 konnte die Bedeutung der Bindestellen Cad1 und Cad2 für die *cadBA*-Transkription mittels  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitätstests untersucht werden (Abb. 9A).



**Abb. 9: Bedeutung der CadC-Bindestellen Cad1 und Cad2 für die *cadBA*-Transkription**

**A:** Schematische Darstellung von Promotor-*lacZ*-Fusionen. *lacZ* lag unter Kontrolle von unterschiedlichen Derivaten des *cadBA*-Promotors  $P_{cad}$ . In *E. coli* CK1 beinhaltete  $P_{cad}$  beide CadC-Bindestellen Cad1 und Cad2. In *E. coli* CK2 fehlte die Bindestelle Cad1 und in *E. coli* CK3 war die Bindestelle Cad2 durch eine 30 bp lange Zufalls-Sequenz ersetzt. **B:** Quantifizierung der *cadBA*-Transkription durch das Reportergen *lacZ*. Die Zellen wurden bei pH 7,6 (■), pH 5,8 (■), pH 7,6 + 10 mM Lysin (■) oder pH 5,8 + 10 mM Lysin (■) bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und anschließend die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach Miller (1972) bestimmt. Als Positivkontrolle in den Experimenten diente der Stamm EP314/pT-*cadC*. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität stellt ein indirektes Mass für die *cadBA*-Transkription dar. Die angegebenen Mittelwerte beruhen auf mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Als Positivkontrolle in den Versuchen diente der Stamm EP314/pT-*cadC*, der chromosomal eine *cadC*-Deletion und eine *cadA-lacZ* Fusion trug. Das Plasmid pT-*cadC* kodierte für ein funktionelles CadC. Der Stamm induzierte die *cadBA*-Expression nur bei Kultivierung in einem Medium mit einem niedrigen pH-Wert (5,8) und der Gegenwart von 10 mM Lysin (Abb. 9B).

Bei Kultivierung der Stämme CK1, CK2 und CK3 unter induzierenden und nicht-induzierenden Bedingungen und der anschließenden Messung der *cadBA*-Transkription zeigte sich eindeutig, das

nur im Stamm CK1, der beide Bindestellen Cad1 und Cad2 trug, eine Transkription des *cadBA*-Operons wie in EP314/pT-*cadC* beobachtet werden konnte, mit einer deutlich erhöhten *cadBA*-Transkription unter Bedingungen eines niedrigen externen pH-Wertes und in Gegenwart von Lysin (Abb. 9 B).

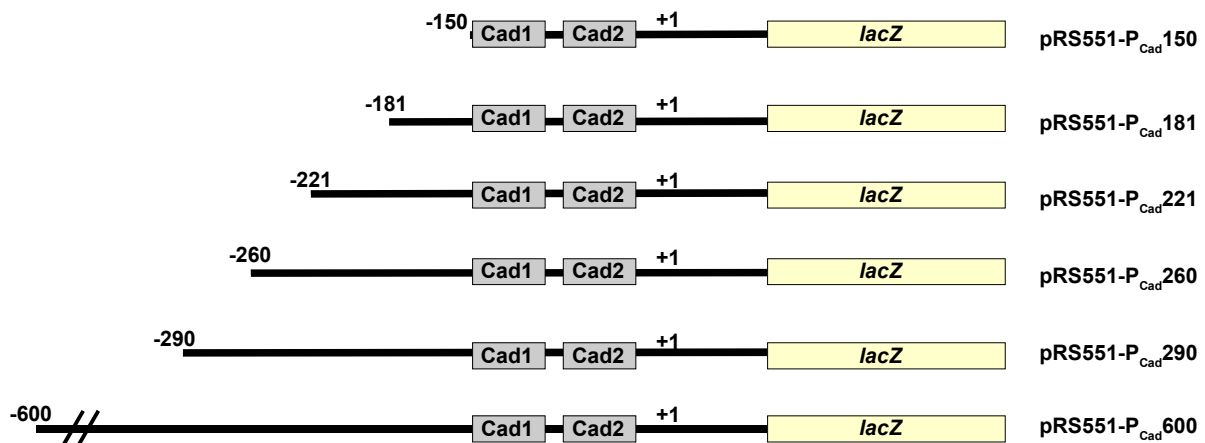
Die beiden Stämme CK2 und CK3 zeigten unter induzierenden Bedingungen keine verstärkte *cadBA*-Transkription im Vergleich zu nicht-induzierenden Bedingungen. In CK2 war die Transkription vergleichbar mit der in CK1 unter nicht-induzierenden Bedingungen, in CK3 war die *cadBA*-Transkription um etwa 50% reduziert.

### 3.2 Repression des *cadBA*-Operons unter nicht-induzierenden Bedingungen

Im Stamm CK1, der beide Bindestellen Cad1 und Cad2 trug, war die *cadBA*-Expression unter nicht-induzierenden Bedingungen deutlich erhöht im Vergleich zu EP314/pT-*cadC*, die Repression des *cadBA*-Operons unter nicht-induzierenden Bedingungen war also deutlich reduziert (Abb. 9B). Die Promotor-*lacZ*-Fusion im Stamm CK1 umfasste den Bereich von bp -150 bis +72 des P<sub>Cad</sub>-Promotors, weiter stromaufwärts gelegene Bereiche der regulatorischen Region des *cadBA*-Operons fehlten. Die verringerte Repression unter nicht-induzierenden Bedingungen in CK1 war möglicherweise darauf zurückzuführen, dass stromaufwärts von Basenpaar -150 der regulatorischen Region des *cadBA*-Operons noch eine oder mehrere Bindestellen für einen negativen Regulator vorhanden waren. Ein möglicher Kandidat für diesen negativen Regulator war das Protein H-NS, da gezeigt werden konnte, dass die *cadBA*-Expression in *hns*-Deletionsmutanten unter nicht-induzierenden Bedingungen deutlich erhöht ist (Shi *et al.*, 1994).

#### 3.2.1 Deletionsanalysen der regulatorischen Region des *cadBA*-Operons

Um die Hypothese einer H-NS-vermittelten Repression zu prüfen, wurden verschieden lange Bereiche der regulatorischen Region des *cadBA*-Operons, beginnend zwischen Basenpaar -150 und -600 stromaufwärts des Transkriptionsstarts, in den Vektor pRS551 kloniert. Daraus resultierten die Plasmid-kodierten Promotor-*lacZ* Fusionen P<sub>Cad150</sub>, P<sub>Cad181</sub>, P<sub>Cad221</sub>, P<sub>Cad260</sub>, P<sub>Cad290</sub> und P<sub>Cad600</sub> (Abb. 10).



**Abb. 10: Konstrukte für Deletionsanalysen der regulatorischen Region des *cadBA*-Operons**

Schematische Darstellung von Promotor-*lacZ*-Fusionen. Unterschiedlich lange Abschnitte der *cadBA*-Promotorregion wurden amplifiziert und in das Plasmid pRS551 vor eine promotorlose Kopie des *lacZ*-Gens kloniert. Daraus resultierten die Plasmide pRS551-P<sub>Cad150</sub>, pRS551-P<sub>Cad181</sub>, pRS551-P<sub>Cad221</sub>, pRS551-P<sub>Cad260</sub>, pRS551-P<sub>Cad290</sub> und pRS551-P<sub>Cad600</sub>.

Die Vektoren wurden in die *E. coli*-Stämme MC4100 (Wildtyp-Referenz) und PD32 (*hns*-Deletionsmutante) transformiert und der Einfluss der Promotorregion auf die *cadBA*-Expression unter verschiedenen Bedingungen untersucht.

Das *cadBA*-Operon wird durch einen neutralen pH-Wert des umgebenden Mediums reprimiert. Um eine pH-abhängige Repression zu untersuchen, wurden die Zellen bei pH 5,8 oder pH 7,6 in LB-Medium kultiviert und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität als Maß für die *cadBA*-Expression bestimmt.

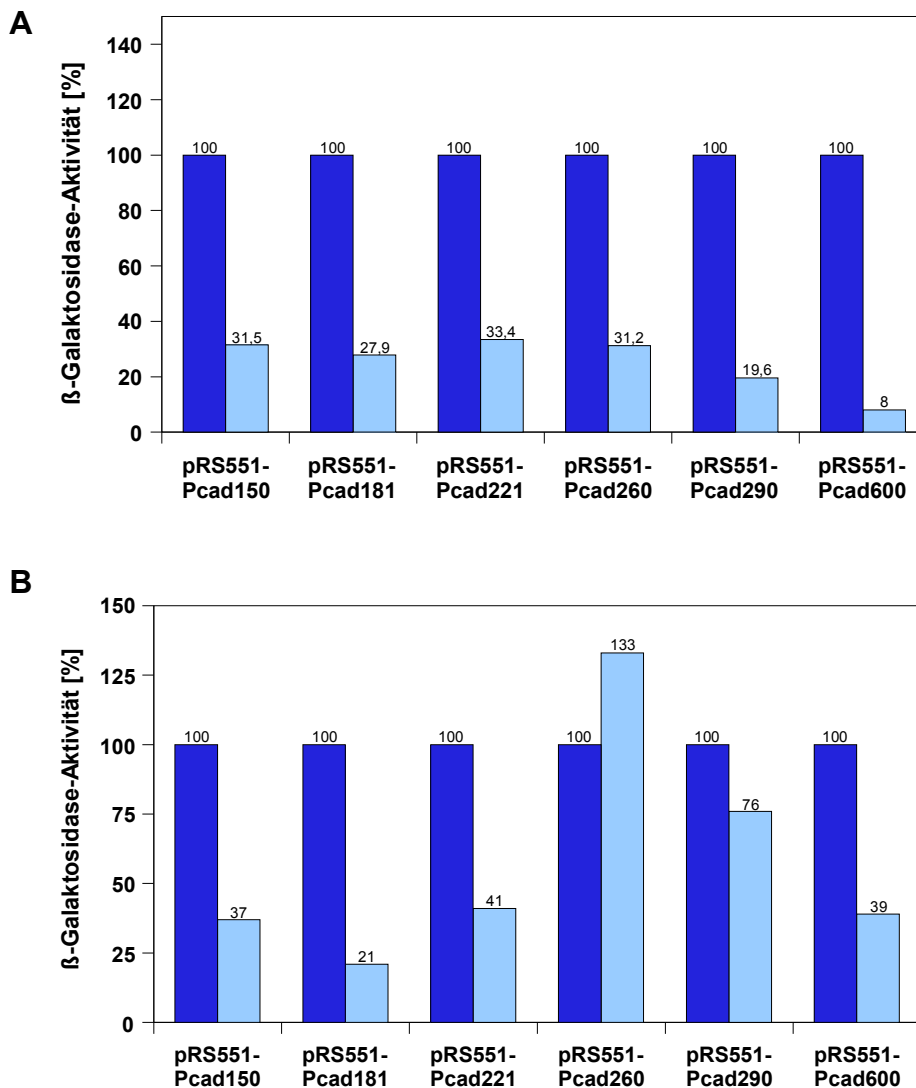
Wenn die Zellen bei neutralen pH-Werten kultiviert wurden, zeigte die Fusion P<sub>Cad</sub>290 im Stamm MC4100 eine signifikant verringerte *cadBA*-Expression im Vergleich zu den Fusionen P<sub>Cad</sub>150, P<sub>Cad</sub>181, P<sub>Cad</sub>221 und P<sub>Cad</sub>260 (Abb. 11 A). Die Fusion P<sub>Cad</sub>600 zeigte eine noch stärker verringerte *cadBA*-Expression. Dies indizierte, dass Bereiche stromaufwärts von bp -260 und bp -290 relevant für eine Repression der *cadBA*-Expression bei neutralen pH-Werten waren.

Bei Kultivierung bei neutralem pH zeigten die Fusionen P<sub>Cad</sub>290 und P<sub>Cad</sub>600 in dem *hns*-Deletionsstamm PD32 hingegen keine signifikant verringerte *cadBA*-Expression im Vergleich zu den Fusionen P<sub>Cad</sub>150, P<sub>Cad</sub>181, P<sub>Cad</sub>221 und P<sub>Cad</sub>260 (Abb. 11 B). In Abwesenheit von H-NS wurde die *cadBA*-Expression bei neutralen pH-Werten also nicht effizient reprimiert.

Sabo *et al.* (1974) zeigten, dass das *cadBA*-Operon unter anaeroben Bedingungen deutlich stärker exprimiert wird als unter aeroben Bedingungen. Um zu untersuchen, ob die zuvor identifizierten Bereiche stromaufwärts von bp -260 auch für die verringerte *cadBA*-Expression unter aeroben Bedingungen verantwortlich sind, wurden die Zellen in LB-Medium bei pH 5,8 unter aeroben oder anaeroben Bedingungen kultiviert. In MC4100 (Abb. 12 A) zeigten die Fusionen P<sub>Cad</sub>290 und P<sub>Cad</sub>600 unter aeroben Bedingungen eine geringere *cadBA*-Expression als unter anaeroben Bedingungen. Die Fusionen P<sub>Cad</sub>150, P<sub>Cad</sub>181, P<sub>Cad</sub>221 und P<sub>Cad</sub>260 hingegen zeigten unter aeroben Bedingungen eine stärkere *cadBA*-Expression als unter anaeroben Bedingungen. Dies indizierte, dass Bereiche stromaufwärts von bp -260 und bp -290 für die verringerte *cadBA*-Expression unter aeroben Bedingungen verantwortlich waren.

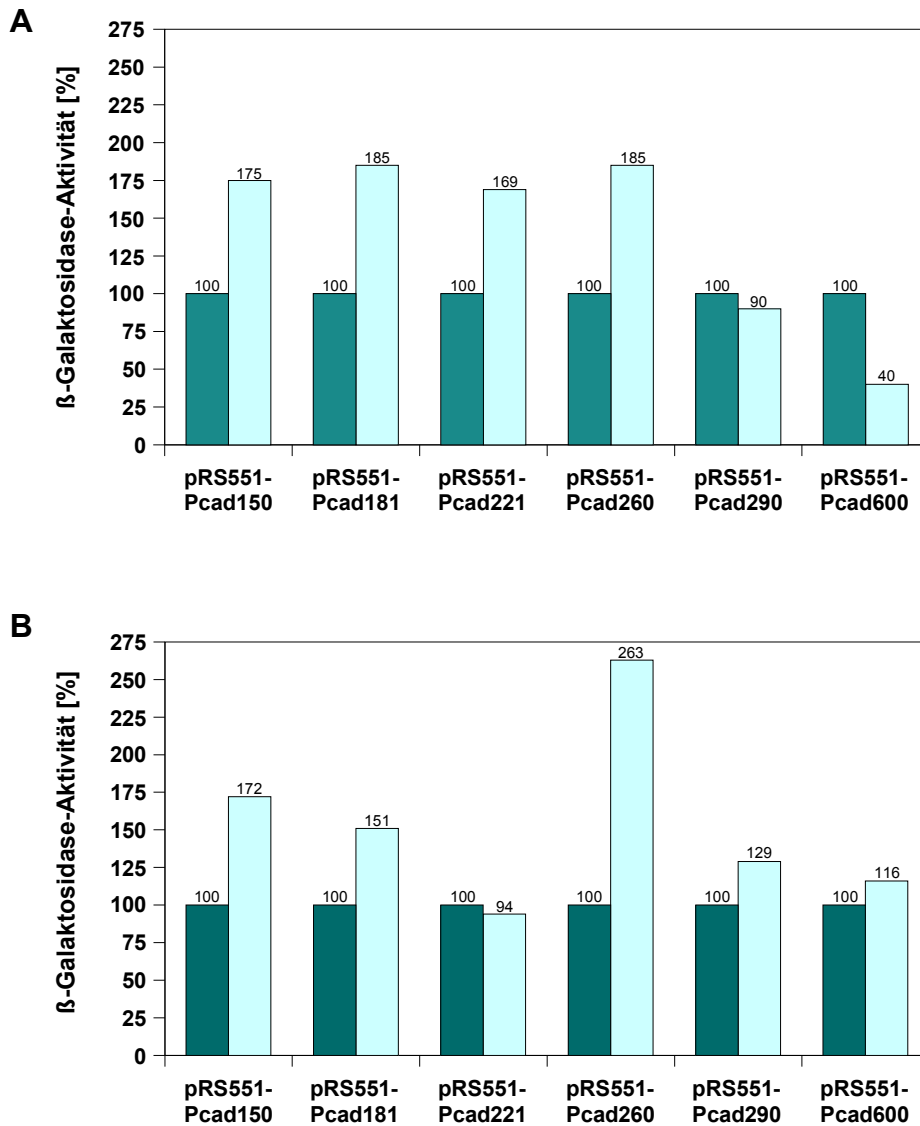
Im *hns*-Deletionsstamm PD32 zeigten alle Fusionen unter aeroben Bedingungen ebenso starke oder noch stärkere *cadBA*-Expressionen als unter anaeroben Bedingungen. H-NS war also ebenfalls wichtig für die verringerte *cadBA*-Expression unter aeroben Bedingungen (Abb. 12 B).

Vor allem die Fusion P<sub>Cad</sub>260 zeigte in *E. coli* PD32 unter nicht-induzierenden Bedingungen teilweise sehr stark erhöhte Aktivitäten, der Grund dafür ist nicht bekannt.



**Abb. 11: Einfluss der *cadBA*-Promotorregion auf die *cadBA*-Expression in Abhängigkeit vom pH-Wert**

Die Plasmide pRS551-P<sub>cad</sub>150, pRS551-P<sub>cad</sub>181, pRS551-P<sub>cad</sub>221, pRS551-P<sub>cad</sub>260, pRS551-P<sub>cad</sub>290 und pRS551-P<sub>cad</sub>600 wurden in die *E. coli*-Stämme MC4100 (Wildtyp) und PD32 ( $\Delta hns$ ) transformiert. Die transformierten Stämme wurden in LB-Medium bei pH 5,8 (■) und pH 7,6 (□) bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität bestimmt. Es wurden jeweils 3 unabhängige Experimente ausgewertet. Die Mittelwerte der Aktivitäten bei pH 5,8 wurden jeweils als 100% definiert. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität stellt ein indirektes Mass für die *cadBA*-Expression dar. **A:** *cadBA*-Expression in *E. coli* MC4100 **B:** *cadBA*-Expression in *E. coli* PD32



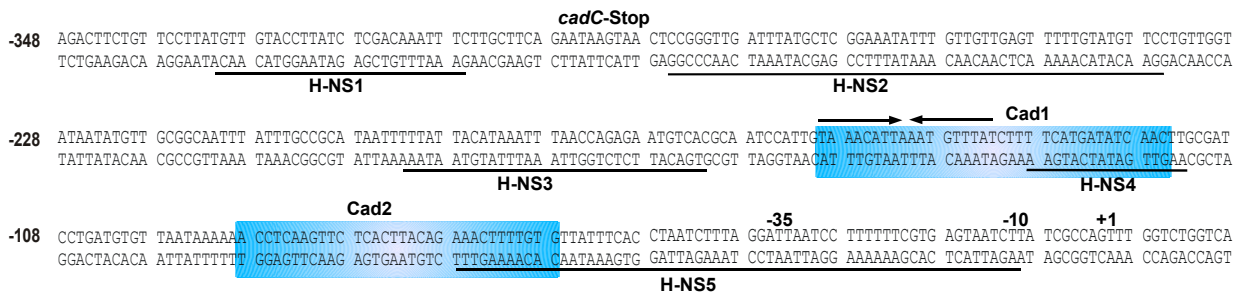
**Abb. 12: Einfluss der *cadBA*-Promotorregion auf die *cadBA*-Expression unter aeroben und anaeroben Bedingungen**

Die Plasmide pRS551-P<sub>Cad</sub>150, pRS551-P<sub>Cad</sub>181, pRS551-P<sub>Cad</sub>221, pRS551-P<sub>Cad</sub>260, pRS551-P<sub>Cad</sub>290 und pRS551-P<sub>Cad</sub>600 wurden in die *E. coli*-Stämme MC4100 (Wildtyp) und PD32 ( $\Delta hns$ ) transformiert. Die transformierten Stämme wurden bei pH 5,8 unter anaeroben (■) oder aeroben (□) Bedingungen bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität bestimmt. Es wurden jeweils 3 unabhängige Experimente ausgewertet. Die Mittelwerte der Aktivitäten unter anaeroben Bedingungen wurden jeweils als 100% definiert. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität stellt ein indirektes Mass für die *cadBA*-Expression dar. **A:** *cadBA*-Expression in *E. coli* MC4100 **B:** *cadBA*-Expression in *E. coli* PD32



### 3.2.2 Computer-gestützte Analyse der *cadBA*-Promotorregion

Es ist bekannt, dass der globale Repressor H-NS keine konservierte DNA-Sequenz als Bindemotiv hat, sondern bevorzugt an gekrümmte DNA-Bereiche bindet (Owen-Hughes *et al.*, 1992). Um solche potentiellen Bindestellen für H-NS innerhalb der regulatorischen Region des *cadBA*-Operons zu identifizieren, wurde die Sequenz der Region mit Hilfe des „BendIt“-Algorithmus (Goodsell und Dickerson, 1994) auf gekrümmte Bereiche hin untersucht, wobei nur Bereiche berücksichtigt wurden, die eine Krümmung  $>5^\circ$  aufwiesen. Es konnten insgesamt 5 Bereiche identifiziert werden, die als „H-NS 1“ bis „H-NS 5“ bezeichnet wurden (Abb. 13). Die potentiellen Bindestellen „H-NS1“ bis „H-NS3“ lagen stromaufwärts von Cad1 und Cad2, die potentielle H-NS-Bindestelle „H-NS4“ überlappte mit der CadC-Bindestelle Cad1 und „H-NS5“ überlappte mit der CadC-Bindestelle Cad2 und der -35/-10-Region des *cadBA*-Promotors.



**Abb. 13: Die *cadBA*-Promotorregion**

Die blau hinterlegten Sequenzen deuten die CadC-Bindestellen Cad1 und Cad2 an, wie sie durch *in vitro* und *in vivo* Experimente ermittelt wurden. Die Pfeile zeigen eine palindromische Sequenz in Cad1 an. Den unterstrichenen und mit „H-NS 1“ bis „H-NS 5“ bezeichneten Sequenzen konnte mit Hilfe des „BendIt“-Algorithmus eine Beugung von mehr als  $5^\circ$  zugeordnet werden und diese Bereiche könnten somit potentielle Bindestellen für den globalen Repressor H-NS darstellen.

### 3.2.3 Notwendigkeit von CadC für die *cadBA*-Expression

Es ist bekannt, dass bei einigen H-NS-reprimierten Genen die entsprechenden Transkriptionsaktivatoren als reiner Antagonist zu H-NS agieren (Dorman, 2004). Um zu überprüfen, ob auch CadC als reiner H-NS-Antagonist wirkt, oder ob CadC für die direkte transkriptionelle Aktivierung des *cadBA*-Operons notwendig ist, wurden die Stämme PD32 ( $\Delta hns$ ) und PD32- $\Delta cad$  ( $\Delta hns$ ,  $\Delta cadC$ ) auf ihre Fähigkeit getestet, die *cadBA*-Expression unter induzierenden oder nicht-induzierenden Bedingungen zu aktivieren. Als Maß für die *cadBA*-Expression wurde dabei die Aktivität der Lysin-Decarboxylase CadA in Zellextrakten von PD32 und PD32- $\Delta cadC$  bestimmt. Wie erwartet konnte eine konstitutive Expression in PD32 beobachtet werden (Abb. 14). In der Doppelmutante PD32- $\Delta cadC$  hingegen, die kein funktionelles CadC

besaß, konnte unter beiden Bedingungen nur eine minimale *cadBA*-Expression gemessen werden.

	induzierende Bedingungen	nicht-induzierende Bedingungen
<b>MC4100</b>	<b>0,52 (±0,04)</b>	<b>0,05 (±0,01)</b>
<b>PD32</b>	<b>0,84 (±0,09)</b>	<b>0,72 (±0,12)</b>
<b>PD32-Δ<i>cadC</i></b>	<b>0,09 (±0,04)</b>	<b>0,03 (±0,02)</b>

**Abb. 14: CadA-Aktivität in *E. coli* MC4100, *E. coli* PD32 und *E. coli* PD32-Δ*cadC***

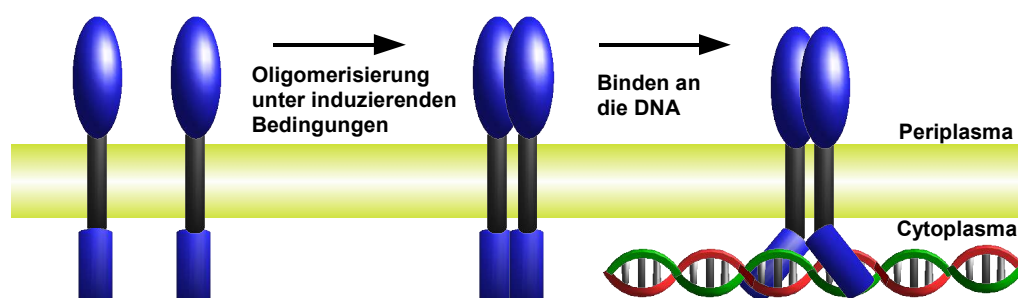
*E. coli* MC4100 (Wildtyp-Referenz) *E. coli* PD32 und *E. coli* PD32-Δ*cadC* wurden unter induzierenden (LB-Medium, pH 5,8) oder nicht-induzierenden (LB-Medium, pH 7,6) Bedingungen bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und die CadA-Aktivität in Zellextrakten bestimmt. Die CadA-Aktivität in den Extrakten stellt ein indirektes Maß für die *cadBA*-Expression dar. Die angegebenen Mittelwerte beruhen auf mindestens drei unabhängigen Messungen., in Klammern sind die Standardabweichungen angegeben.

### 3.3 Untersuchungen zum Aktivierungsmechanismus von CadC

Die ToxR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren zeichnen sich durch eine ungewöhnliche Transmembrantopologie aus, die ihnen zugleich die extrazelluläre Reizwahrnehmung als auch die intrazelluläre Transkriptionsregulation erlaubt. Die Umgebungsbedingungen modulieren also die Aktivität dieser Regulatoren. Welche mechanistischen Änderungen innerhalb des Proteins aber dabei vonstatten gehen, ist unbekannt. Für ToxR aus *Vibrio cholerae* wurden eingehende Untersuchungen zur Aufklärung eines möglichen Aktivierungsmechanismus durchgeführt, ein universelles Prinzip, das sich auch auf CadC übertragen ließe, konnte dabei aber nicht identifiziert werden. Aus diesem Grund sollten mögliche Aktivierungsmechanismen von CadC und die Rolle der periplasmatischen Domäne und der Membranlokalisation untersucht werden.

#### 3.3.1 Das Oligomerisierungsmodell

Über den oligomeren Zustand von CadC war bis zu Beginn dieser Arbeit nichts bekannt. Die Struktur des  $P_{Cad}$ -Promotors, der zwei Bindestellen für CadC enthält, indiziert, dass CadC als Dimer oder höheres Oligomer an die DNA binden und die Transkription aktivieren könnte. Neben dem Oligomerisierungszustand von CadC sollte auch ein Oligomerisierungsmodell für die Aktivierung von CadC überprüft werden. Diesem Modell zufolge liegt CadC unter nicht-induzierenden Bedingungen als Monomer mit einer geringen Affinität zum  $P_{Cad}$ -Promotor vor. Unter induzierenden Bedingungen lagern sich CadC-Moleküle zu Oligomeren mit einer hohen Affinität zu  $P_{Cad}$  zusammen, wodurch die Bindung an die DNA und die Aktivierung der *cadBA*-Transkription ermöglicht wird (Abb. 15).



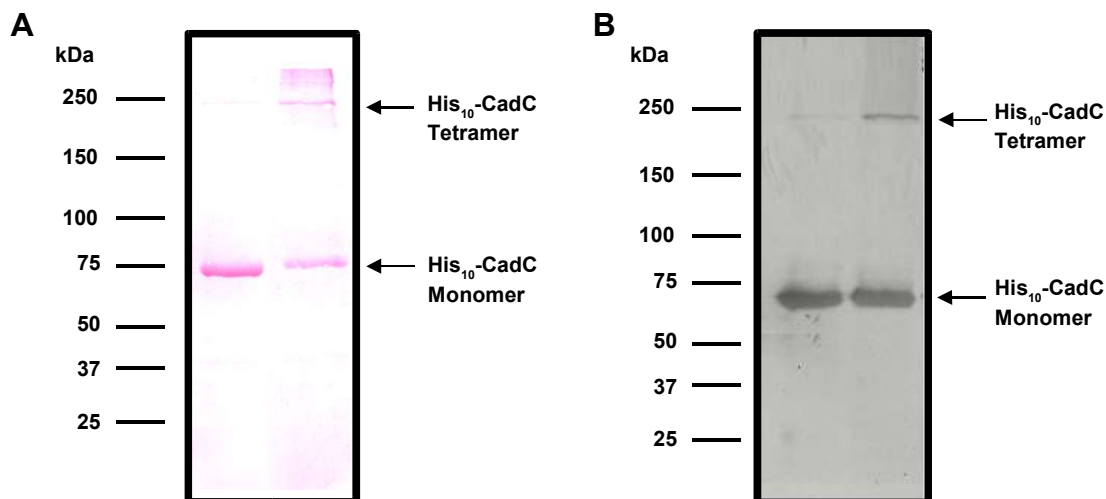
**Abb. 15: Das Oligomerisierungsmodell**

Schematische Darstellung einer Aktivierung der *cadBA*-Expression durch Oligomerisierung von CadC. Unter nicht-induzierenden Bedingungen liegt CadC als Monomer vor und kann nicht an  $P_{Cad}$  binden. Unter induzierenden Bedingungen kommt es zur Oligomerisierung von CadC, was eine Bindung an  $P_{Cad}$  ermöglicht.

### 3.3.1.1 Quervernetzungsstudien *in vitro*

Mit Quervernetzungsstudien sollte untersucht werden, ob gereinigtes His<sub>10</sub>-CadC höhere oligomere Formen ausbilden kann. Als chemischer Crosslinker in den Experimenten diente Bis-maleimidohexan (BMH; Pierce). Dieser nicht-spaltbare Crosslinker kann die Sulfhydrylgruppen von Cysteinresten quervernetzen und hat dabei eine Spannweite von bis zu 1,6 nm. CadC enthält die drei Cysteinreste C172, C208 und C272, die von BMH quervernetzt werden könnten. C172 ist in der Transmembrandomäne, C208 und C272 sind in der periplasmatischen Domäne lokalisiert. Nach Angaben des Herstellers eignet sich BMH für Quervernetzungsstudien in einem pH-Wertbereich zwischen 6,5 und 7,5. Um CadC-aktivierende Bedingungen besser zu simulieren, wurden jedoch auch Experimente bis pH 5,8 durchgeführt.

Die Quervernetzungsstudien wurden zunächst mit gereinigtem und rekonstituierten His<sub>10</sub>-CadC durchgeführt. Die Proben wurden nach der Inkubation mit BMH über eine SDS-PAGE aufgetrennt und His<sub>10</sub>-CadC mit dem Penta-His-Antikörper detektiert. Dabei zeigten sich eine CadC-Monomer Bande bei ca. 65 kDa und eine weitere distinkte Bande bei ca. 250 kDa. Die Größe der Bande deutete darauf hin, dass es sich dabei um ein Tetramer von His<sub>10</sub>-CadC handelte. In der nicht mit BMH behandelten Kontrolle war die Bande bei 250 kDa nur sehr schwach ausgeprägt (Abb. 16).

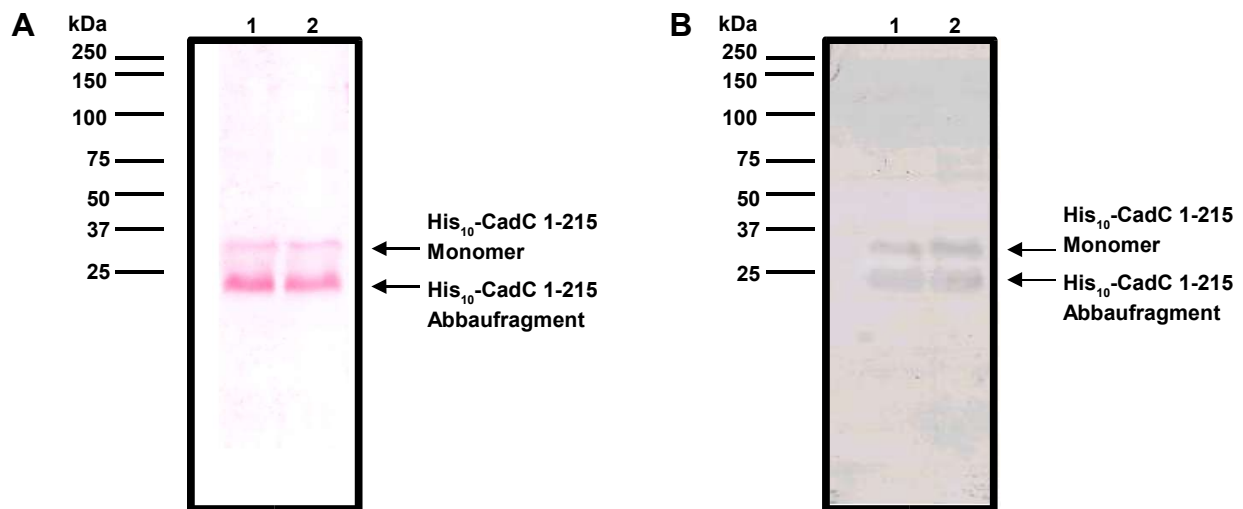


**Abb. 16: Quervernetzungsstudien mit gereinigtem His<sub>10</sub>-CadC**

Gereinigtes und rekonstituiertes His<sub>10</sub>-CadC wurde 60 min bei 25°C ohne BMH (Spur 1) oder mit 2 mM BMH (Spur 2) inkubiert. Die Proben wurden anschließend einer SDS-PAGE unterzogen und auf eine Nitrozellulosemembran gebロットet. Links ist jeweils ein Molekulargewichtsstandard dargestellt. **A:** Mit Ponceau-Rot angefärbte Membran. **B:** Mit dem Penta-His-Ak detektiertes His<sub>10</sub>-CadC.

Um den Einfluss der C-terminalen Domäne auf die Oligomerisierung von His<sub>10</sub>-CadC zu testen, wurde das Peptid His<sub>10</sub>-CadC 1-215 gereinigt und rekonstituiert. Bei dem Peptid-His<sub>10</sub>-CadC 1-215 handelte es sich um ein C-terminal verkürztes Derivat von His<sub>10</sub>-CadC, das noch die ersten 215 As

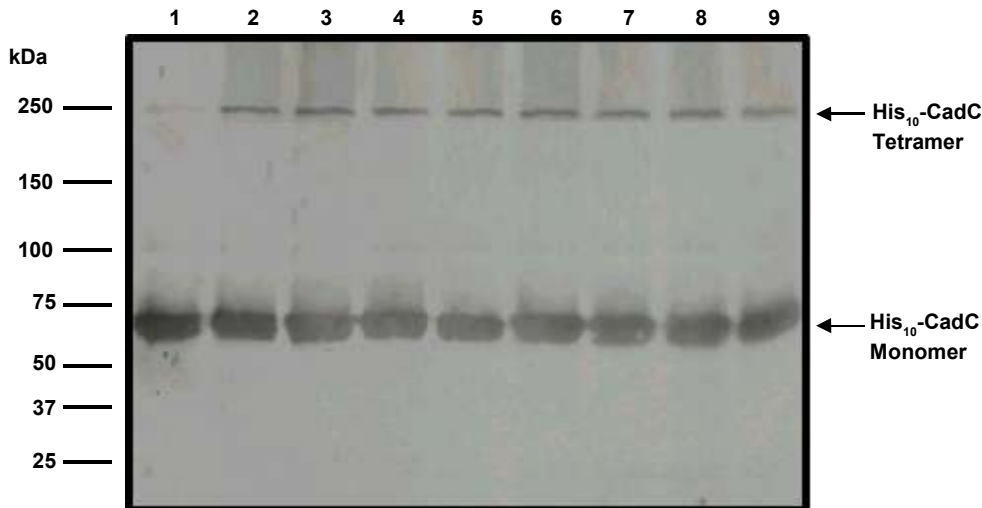
enthielt. Es umfasste die N-terminale Domäne, die Transmembrandomäne und die ersten 28 As der C-terminalen Domäne von CadC. His<sub>10</sub>-CadC 1-215 enthielt noch die zwei Cysteinreste C172 und C208. Bei Quervernetzungsstudien konnten neben der Monomerbande von His<sub>10</sub>-CadC 1-215 noch eine weitere Bande detektiert werden, die eine starke Degradation von His<sub>10</sub> CadC 1-215 indizierte. Hingegen konnte keine Banden detektiert werden, die auf eine Oligomerisierung von His<sub>10</sub> CadC 1-215 schließen ließen (Abb. 17).



**Abb. 17: Quervernetzungsstudien mit gereinigtem His<sub>10</sub>-CadC 1-215**

Gereinigtes und rekonstituiertes His<sub>10</sub>-CadC 1-215 wurde 60 min bei 25°C ohne BMH (Spur 1) oder mit 2 mM BMH (Spur 2) inkubiert. Die Proben wurden anschließend einer SDS-PAGE unterzogen und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Links ist jeweils ein Molekulargewichtsstandard dargestellt. **A:** Mit Ponceau-Rot angefärbte Membran. **B:** Mit dem Penta-His-Ak detektiertes His<sub>10</sub>-CadC

*In vivo* haben pH-Wert, die Lysin- und die Cadaverin-Konzentration einen Einfluss auf die *cadBA*-Expression. Um zu testen, ob diese Faktoren auch die Oligomerisierung von His<sub>10</sub>-CadC *in vitro* beeinflussten, wurden His<sub>10</sub>-CadC-haltige Membranvesikel in K-Phosphatpuffer bei verschiedenen pH-Werten resuspendiert. Zudem wurde auch getestet, ob durch Zugabe von Lysin und DNA mit der Sequenz der CadC-Bindestellen die Oligomerisierung verstärkt oder durch Zugabe von Cadaverin die Oligomerisierung verringert werden könnte. Es konnte jedoch unter keiner der getesteten Bedingungen eine signifikant veränderte Oligomerisierung von His<sub>10</sub>-CadC beobachtet werden (Abb. 18).



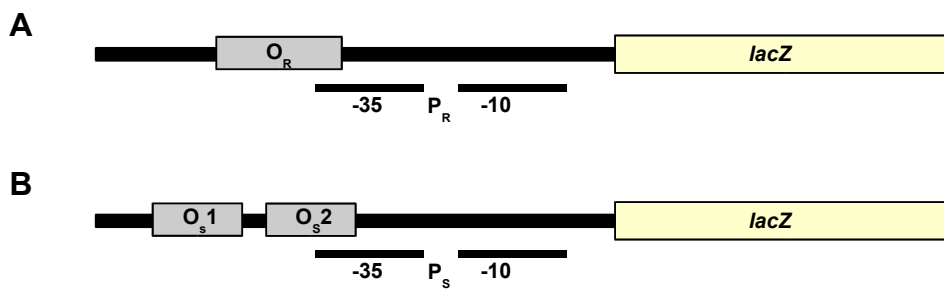
**Abb. 18: Oligomerisierung von His<sub>10</sub>-CadC *in vitro* in Abhängigkeit der Umgebungsbedingungen**

Membranvesikel *E. coli* BL21/pET16b-*cadC* wurde 60 min bei 25°C ohne BMH (Spur 1) oder mit 2 mM BMH (Spur 2-9) inkubiert. Die Proben wurden anschließend einer SDS-PAGE unterzogen und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Die Membranvesikel wurden unter folgenden Bedingungen inkubiert: **Spur 2:** pH 5,8 **Spur 3:** pH 6,5 **Spur 4:** pH 7,5 **Spur 5:** pH 5,8, 30 mM Lysin, 1 µg DNA **Spur 6:** pH 6,5, 30 mM Lysin, 1 µg DNA **Spur 7:** pH 7,5, 30 mM Lysin, 1 µg DNA **Spur 8:** pH 5,8, 10 mM Cadaverin **Spur 9:** pH 7,5, 10 mM Cadaverin. Bei der DNA handelte es sich dabei um das Plasmid pUC19-P<sub>Cad</sub>150, das die Sequenz der *cadBA*-Promotorregion trug.

### 3.3.1.2 *In vivo* Versuche zur Oligomerisierung

Um den Oligomerisierungszustand von CadC *in vivo* zu untersuchen, wurde ein Lambda-Fusions-System verwendet (Hu *et al.*, 1990). Dafür wurde das *cadC*-Gen in das Plasmid pJH391 kloniert. Das resultierende Plasmid pJH391-*cadC* trug das Fusionsgen  $\lambda$  *cI-cadC* unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren *lacUV5*-Promotors und kodierte für ein Hybridprotein, in dem die N-terminale DNA-bindende Domäne des  $\lambda$ CI-Repressors an den N-Terminus von CadC fusioniert war. Die N-terminale Domäne des  $\lambda$ CI-Repressors allein ist nicht in der Lage, Dimere auszubilden. Da die Bindung des  $\lambda$ CI-Repressors an den Operator  $\lambda$  O<sub>R</sub> aber nur als Dimer erfolgen kann, kann nur eine Di- bzw. Oligomerisierung des Fusionspartners, in diesem Falle CadC, eine funktionelle Bindung des  $\lambda$ CI-Repressors an  $\lambda$  O<sub>R</sub> ermöglichen. Diese funktionelle Bindung kann durch die Repression der *lacZ*-Expression in den Reporterstämmen *E. coli* JH372 (Dimerisierung) oder *E. coli* JH607 (höhere Oligomerisierung) gemessen werden.

Die Fähigkeit von CadC, den N-terminal fusionierten  $\lambda$ CI-Repressor zu oligomerisieren, wurde zunächst in dem Reporterstamm JH372 getestet. JH372 trägt ein *lacZ*-Gen, das unter der Kontrolle von  $\lambda$  P<sub>RO</sub>R liegt (Abb. 19 A).



**Abb. 19:  $\lambda$  Operator/Promotor-*lacZ*-Fusionen**

A:  $\lambda$  Operator/Promotor-*lacZ*-Fusionen in *E. coli* JH372

B:  $\lambda$  Operator/Promotor-*lacZ*-Fusionen in *E. coli* JH607

Durch Bindung des dimerisierten  $\lambda$ CI-Repressors an  $\lambda O_R$  wird die *lacZ*-Expression reprimiert, eine verringerte  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität des Stamms zeigt also eine verstärkte Oligomerisierung an. Für die Versuche wurde JH372/pJH391-*cadC* in LB-Medium bei pH 5,8 oder pH 7,6 bis zur stationären Phase kultiviert und anschließend die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Als Negativkontrollen dienten *E. coli* JH372 und *E. coli* JH372/pKH101; das Plasmid pKH101 kodierte für die N-terminale Domäne des  $\lambda$ CI-Repressors. Als Positivkontrolle wurde *E. coli* JH372/pJH370 verwendet; das Plasmid pJH370 kodierte für ein Hybridprotein zwischen der N-terminalen Domäne des  $\lambda$ CI-Repressors und dem Hefeprotein GCN4.

Im Stamm *E. coli* JH372, in dem kein Derivat des  $\lambda$ CI-Repressors synthetisiert wurde, lagen die Aktivitäten bei über 1000 Miller-Units (Abb. 20 A). In *E. coli* JH372/pKH101, in dem ein Derivat des  $\lambda$ CI-Repressors synthetisiert wurde, das aufgrund einer fehlenden Dimerisierungsdomäne nur sehr schwach oder gar nicht an  $\lambda O_R$  binden konnte, lagen die Aktivitäten bei ca. 500 Miller-Units. In der Positivkontrolle *E. coli* JH372/pJH370 lagen die gemessenen Aktivitäten bei ca. 100 Miller-Units. Für *E. coli* JH372/pJH391-*cadC* wurden bei Kultivierung bei pH 5,8 Aktivitäten von ca. 150, bei Kultivierung bei pH 7,6 von ca. 200 Miller-Units gemessen. Das Ergebnis deutete darauf hin, dass CadC als Oligomer vorlag. Ein signifikanter Einfluss des pH-Wertes auf die CadC-Oligomerisierung konnte allerdings nicht beobachtet werden. Unter beiden Bedingungen lagen die gemessenen Aktivitäten deutlich unter denen der Negativkontrolle.

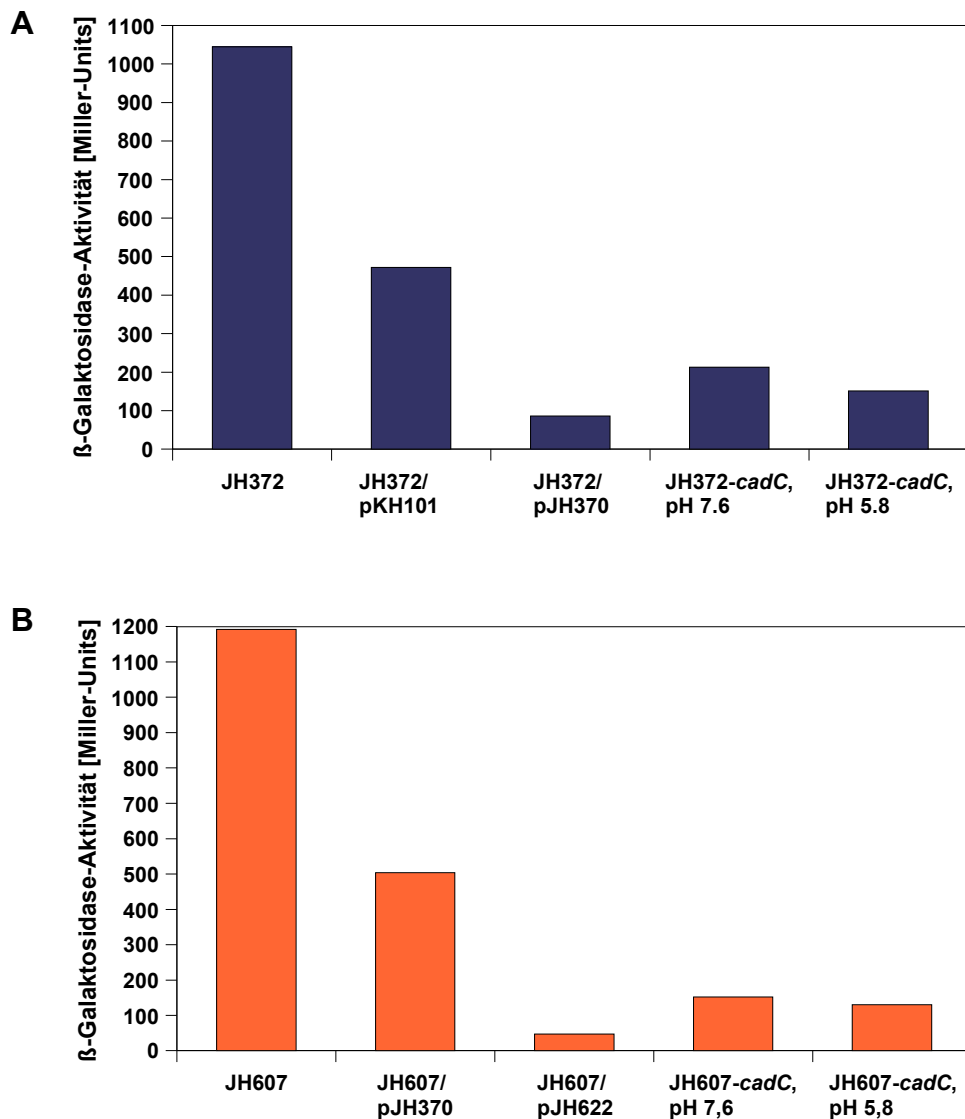
In einem weiteren Experiment wurde getestet, ob externes Cadaverin Einfluss auf die CadC-Oligomerisierung in *E. coli* JH372/pJH391-*cadC* hatte. Wie bereits gezeigt wurde, inhibiert Cadaverin die *cadBA*-Expression *in vivo*. Ein signifikanter Einfluss auf die Oligomerisierung von CadC konnte jedoch nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Im Stamm *E. coli* JH372 kann nur die generelle Fähigkeit zur Oligomerisierung getestet werden.

Dabei kann allerdings nicht unterschieden werden, ob es sich um Dimere, Tetramere oder noch höhere Oligomere handelt. Daher wurde die CadC-Oligomerisierung auch in *E. coli* JH607 gemessen (Abb. 19 B). JH607 trägt ein *lacZ*-Gen, das unter der Kontrolle der  $\lambda$  112O<sub>S</sub>P<sub>S</sub>-Promotorregion liegt. Die  $\lambda$  112O<sub>S</sub>P<sub>S</sub>-Promotorregion besteht aus dem starken O<sub>S</sub>1-Operator, dem schwachen O<sub>S</sub>2-Operator und dem P<sub>S</sub>-Promotor, wobei der O<sub>S</sub>2-Operator den P<sub>S</sub>-Promotor überlappt. Die *lacZ*-Expression wird also nur durch eine Bindung an O<sub>S</sub>2 reprimiert. Als Dimer kann der  $\lambda$ CI-Repressor an O<sub>S</sub>1 binden, die Bindung an O<sub>S</sub>2 ist aber nur sehr schwach und instabil. Eine stabile Bindung an O<sub>S</sub>2 erfolgt nur bei einer Interaktion mit dem an O<sub>S</sub>1 gebundenen Dimer. Folglich kann die *lacZ*-Expression in diesem Stamm durch ein Dimer-bildendes Hybridprotein nicht effektiv reprimiert werden, sondern nur durch tetramere oder kooperativ bindende dimere Hybridproteine.

*E. coli* JH607/pJH391-*cadC* wurde in LB-Medium bei pH 5,8 oder pH 7,6 bis zur stationären Phase kultiviert. Als Negativkontrollen dienten *E. coli* JH607 und *E. coli* JH607/pJH370, als Positivkontrolle diente *E. coli* JH607/pJH622. Das vom Plasmid pJH370 kodierte  $\lambda$ CI-GCN4-Derivat tendiert zur Dimerisierung, das von pJH622 kodierte  $\lambda$ CI-GCN4-Derivat hingegen tendiert zur Tetramerisierung. Für JH607 lagen die gemessenen Aktivitäten bei ca. 1200 Miller-Units, für JH607/pJH370 bei ca. 550. Die Positivkontrolle JH607/pJH622 zeigte Aktivitäten von ca. 50 Miller-Units (Abb. 20 B). JH607/pJH391-*cadC* wies Aktivitäten von 130 Miller-Units auf, wenn bei pH 5,8 kultiviert, und 152 Miller-Units, wenn bei pH 7,6 kultiviert. Diese Ergebnisse indizierten, dass CadC Tetramere oder kooperativ bindende Dimere bildete, wie die deutlich verstärkte *lacZ*-Repression verglichen mit der Negativkontrolle JH607/pJH370 zeigte. Allerdings konnte auch hier kein deutlicher Unterschied in der Oligomerisierung bei pH 5,8 oder pH 7,6 beobachtet werden.





**Abb. 20: Oligomerisierung von CadC *in vivo***

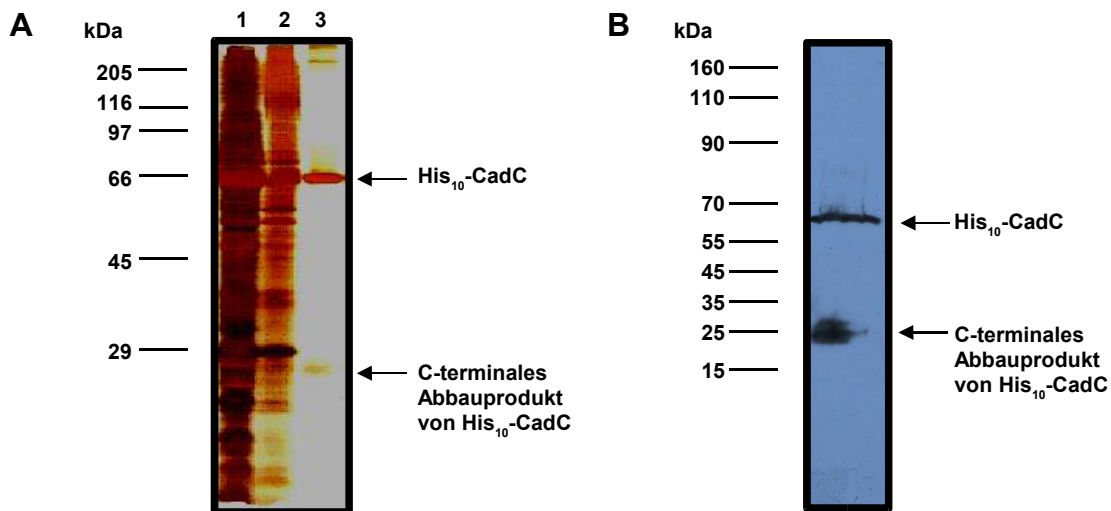
Die Repression der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität stellt hier ein indirektes Maß für die Fähigkeit von Proteinen dar, die C-terminale (Dimerisierungs-)Domäne des  $\lambda$  CI-Repressors funktionell zu ersetzen. Zellen wurden bis zur stationären Wachstumsphase kultiviert und anschließend die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Die abgebildeten Mittelwerte beruhen auf zwei unabhängigen Messungen.

**A:** In *E. coli* JH372 wurde auf die Fähigkeit von CadC zur Oligomerisierung getestet. JH372-cadC ist *E. coli* JH372, transformiert mit dem Plasmid pJH391-cadC, das für ein  $\lambda$ CI-CadC-Hybridprotein kodierte. JH372-cadC wurde in LB 5,8 oder LB 7,6 kultiviert, alle anderen Stämme in LB 7,6. pKH101 kodierte für die N-terminale Domäne von  $\lambda$ CI, pJH370 für ein  $\lambda$ CI-GCN4-Derivat, das Dimere ausbildet.

**B:** In *E. coli* JH607 wurde auf die Fähigkeit von CadC zur Tetramerisierung/kooperativen Bindung getestet. JH607-cadC ist *E. coli* JH607, transformiert mit dem Plasmid pJH391-cadC, das für ein  $\lambda$ CI-CadC-Hybridprotein kodierte. JH607-cadC wurde in LB 5,8 oder LB 7,6 kultiviert, alle anderen Stämme in LB 7,6. pJH370 kodierte für ein  $\lambda$ CI-GCN4-Derivat, das Dimere ausbildete. pJH622 kodierte für ein  $\lambda$ CI-GCN4-Derivat, das Tetramere ausbildete.

### 3.3.2 Das Proteolysemodell

Bereits bei früheren Untersuchungen konnte bei der Überproduktion von His<sub>10</sub>-CadC häufig ein Peptid von ca. 20-25 kDa durch den Penta-His-Antikörper detektiert werden (Küper, 2001). Auch bei der Reinigung von His<sub>10</sub>-CadC über Ni<sup>2+</sup>-NTA- Affinitätschromatographie wurde dieses Peptid mitgereinigt, was darauf schließen ließ, dass es sich bei dem Peptid um ein C-terminales Abbauprodukt von His<sub>10</sub>-CadC handelte (Abb. 21).

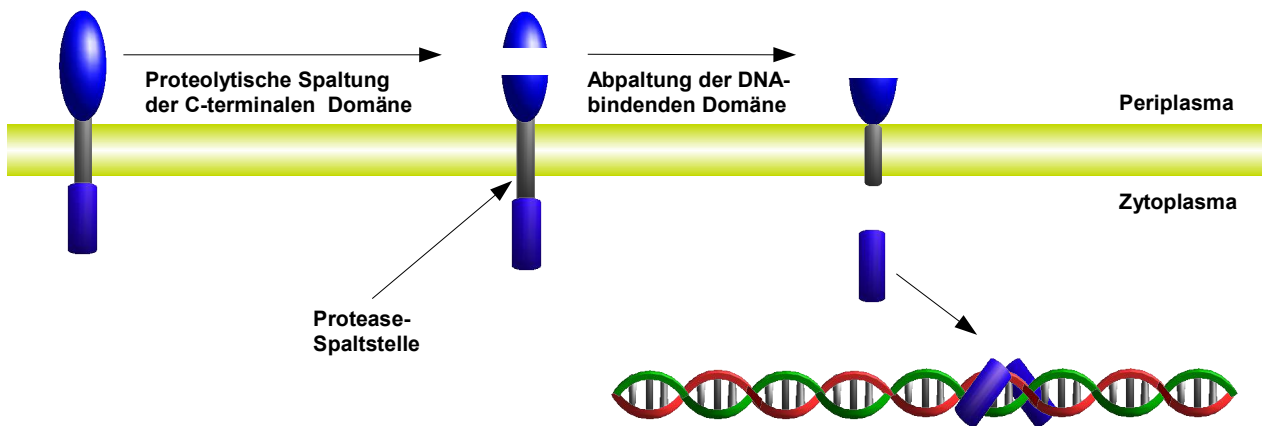


**Abb. 21: Proteolytische Spaltung von His<sub>10</sub>-CadC**

**A:** Silbergel einer Reinigung von His<sub>10</sub>-CadC über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie **Spur 1:** Membranvesikel *E. coli* BL21/pET16b-*cadC* **Spur 2:** in 0,2% LDAO solubilisierte Membranproteine **Spur 3:** gereinigtes His<sub>10</sub>-CadC  
**B:** Immunodetektion von His<sub>10</sub>-CadC in Membranvesikel *E. coli* BL21/pET16b-*cadC* mit dem Penta-His-Antikörper

Ausgehend von dieser Beobachtung wurde das Proteolysemodell für einen möglichen Aktivierungsmechanismus von CadC entwickelt. Die Transmembrantopologie ist für einen bakteriellen Transkriptionsaktivator ungewöhnlich. Die überwältigende Anzahl von Transkriptionsregulatoren liegen als zytoplasmatische Proteine vor, die durch freie Diffusion die Zielsequenz auf dem Chromosom sehr schnell erreichen können. Aufgrund seiner Topologie ähnelt CadC eukaryontischen Transkriptionsfaktoren wie Notch oder APP (Zupicich *et al.*, 2001). Diese sind durch die Integration in die Zytoplasmamembran räumlich getrennt vom Nukleus und können in membranintegrierter Form keine regulatorische Funktion ausüben. Die transkriptionsaktivierende Untereinheit wird in diesen Proteinen durch eine Regulierte Proteolyse (RP) vom membranständigen Teil des Proteins abgespalten und kann anschließend in den Nukleus eindringen. Die entwickelte Arbeitshypothese besagt, dass unter nicht-induzierenden Bedingungen CadC als membranintegriertes Protein vorliegt, das von der Membran aus das *cadBA*-Operon nicht aktivieren kann. Unter induzierenden Bedingungen kommt es durch Konformationsänderungen in der

periplasmatischen C-terminalen Domäne zu einer Exposition einer oder mehrerer Proteaseschnittstellen, was letztlich zur Abspaltung der N-terminalen zytoplasmatischen Domäne führt, die als frei-diffundierbares Molekül den *cadBA*-Promotor erreichen kann (Abb. 22).

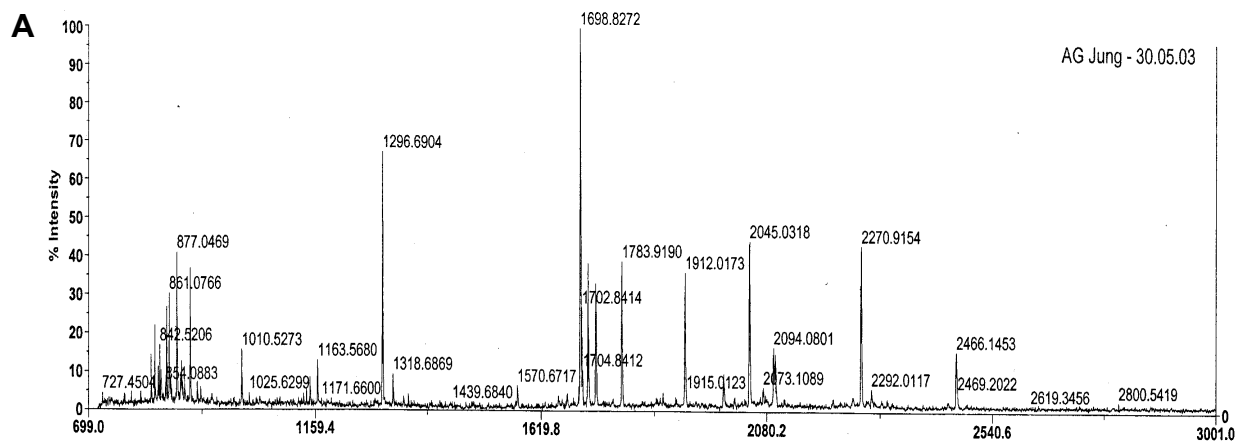


**Abb. 22: Das Proteolysemodell**

Schematische Darstellung einer Aktivierung der *cadBA*-Expression durch proteolytische Spaltung von CadC. Unter nicht-induzierenden Bedingungen ist CadC membrangebunden und kann durch die räumliche Trennung vom Chromosom nicht an  $P_{Cad}$  binden. Unter induzierenden Bedingungen kommt es zu einer proteolytischen Spaltung in der C-terminalen periplasmatischen Domäne, die wiederum zu einer Freilegung einer Proteaseschnittstelle in der Transmembrandomäne oder der N-terminalen zytoplasmatischen Domäne führt. Nach der proteolytischen Abspaltung der N-terminalen Domäne kann diese frei im Zytoplasma diffundieren und an  $P_{Cad}$  binden.

### 3.3.2.1 Massenspektrometrische Analyse des Peptids

Zunächst wurde durch eine massenspektrometrischen Analyse die Identität des beobachteten Peptids aufgeklärt. Das Peptid wurde aus einem Proteingel herausgelöst und durch Trypsinierung gespalten. Die Analyse der Massen der durch die Trypsinierung entstandenen Peptide auf einem Massenspektrometer führte zu einem spezifischen "Fingerabdruck", der eindeutig CadC zugeordnet werden konnte (Abb. 23). Bei der Analyse der insgesamt 9 identifizierten und CadC zugeordneten Peptide zeigte sich, dass neben 6 Peptiden, die eindeutig der N-terminalen Domäne entstammten, auch 3 Peptide auftauchten, die der C-terminalen Domäne entstammten.

**B**

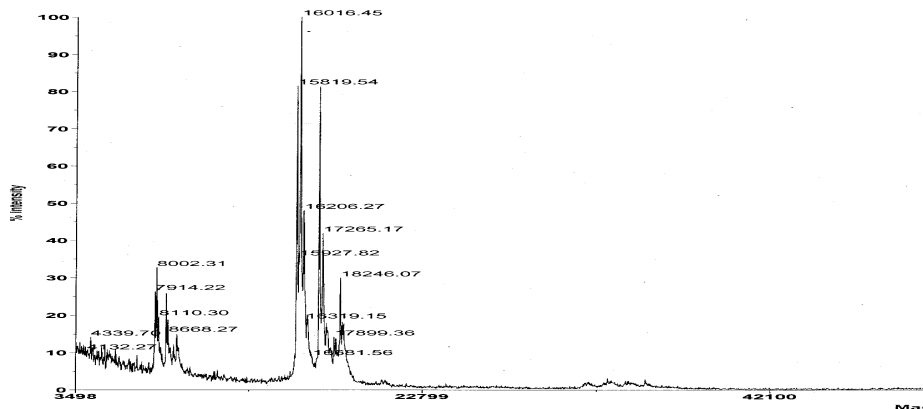
Gemessene Masse	Berechnete Masse	Peptidstart	Peptidende	Peptidsequenz
885,55	855,48	26	32	QLTLEPR
1147,61	1147,64	256	265	TLSIAFVNQR
1697,82	1697,91	8	22	VGEWLVTPSINQISR
1781,91	1781,96	61	76	SIVTNHVVTQSISELR
1910,02	1910,06	61	77	SIVTNHVVTQSISELRK
1989,96	1989,99	78	95	SLKDNEDESPVYIATVPK
2043,02	2043,11	33	50	LIDLLVFFAGHSGEVLSR
2095,99	2096,04	358	376	ASELLGEIVQSSPEFTYAR
2290,06	2290,1	334	353	GALLTNFVQAHDYLLHGDDK

**Abb. 23: Identifizierung des Peptids**

Das charakteristische Peptid, das bei der Reinigung von His<sub>10</sub>-CadC auftrat, wurde aus einem Coomassie-gefärbtem SDS-Gel ausgeschnitten und nach einer Trypsinierung ein Massenspektrum der entstandenen Peptide aufgenommen (Auftragsarbeit der Fa. Esplora, Darmstadt). **A**: Massenspektrum **B**: Masse und Sequenz der Peptide, die eindeutig CadC zugeordnet werden konnten. Die Positionen der Aminosäuren wurden so beziffert, dass das erste Methionin im Wildtyp-Protein in der Aminosäuresequenz mit "1" bezeichnet wurde. Der His-Tag und die Linker-Region von His<sub>10</sub>-CadC wurden nicht berücksichtigt.

Um die genaue Masse der abgespaltenen Domäne zu bestimmen, wurde auch die gesamte Elutionsfraktion der His<sub>10</sub>-CadC Reinigung mit dem Massenspektrometer (ohne vorherige Trypsinierung!) analysiert. Dabei zeigte der interessante Massenbereich zwischen 15 und 19 kDa mehrere Peaks, die nicht eindeutig einem einzelnen möglichen Proteolyseprodukt zugeordnet werden konnten (Abb. 24). Vier Peaks des Spektrums ließen sich einer möglichen abgespaltenen N-terminalen Domäne von His<sub>10</sub>-CadC zuordnen.

A



B

Gemessene Masse	Berechnete Masse	Größe der abgespaltenen Domäne
16319,15	16319,33	As 1-126
17074,56	17074,68	As 1-134
17265,17	17265,74	As 1-131
18443,21	18443,31	As 1-142

#### Abb. 24: Teil des Massenspektrums von gereinigtem His<sub>10</sub>-CadC

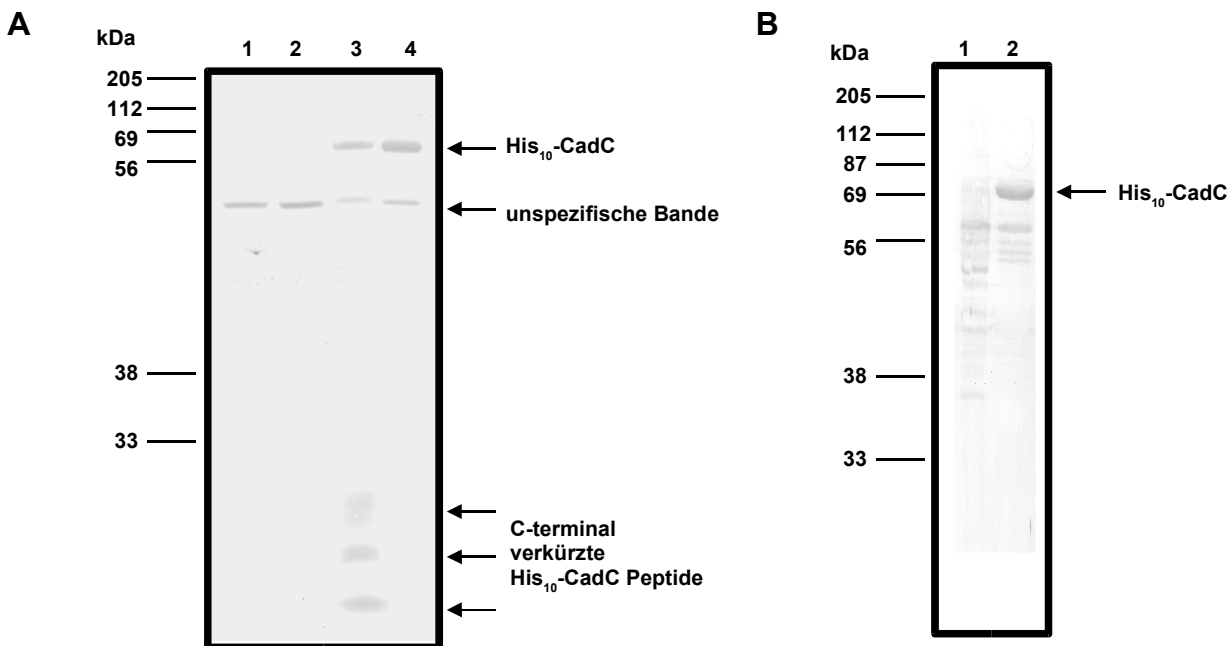
His<sub>10</sub>-CadC wurde wie unter 2.5.1 beschrieben gereinigt. Von dem gereinigten His<sub>10</sub>-CadC wurde ein Massenspektrum aufgenommen (Auftragsarbeit der Fa. Esplora, Darmstadt). **A:** Dargestellt ist der Teil des Spektrums, in dem erwartungsgemäß das abgespaltene Peptid liegen müsste. **B:** Identifizierung der Peptide, die theoretisch die abgespaltene N-terminale Domäne repräsentieren könnten. Bei der Größe der abgespaltenen Domäne wurden die Positionen der Aminosäuren so beziffert, dass das erste Methionin im Wildtyp-Protein in der Aminosäuresequenz mit "1" bezeichnet wurde. Der His-Tag und die Linker-Region von His<sub>10</sub>-CadC wurden nicht berücksichtigt.

#### 3.3.2.2 Nachweis der N-terminalen Domäne im Zytoplasma

Um eine mögliche abgespaltene N-terminale Domäne von CadC im Zytoplasma direkt nachzuweisen, wurden zwei Strategien gewählt. Zunächst wurde versucht, das Spaltprodukt mit Antikörpern nachzuweisen. Dazu wurde His<sub>10</sub>-CadC im Stamm *E. coli* BL21/pET16b-cadC bei einem pH-Wert des Mediums von 5,8 oder 7,6 überproduziert und anschließend die Zytoplasma- und die Membranfraktionen der Zellen präpariert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und His<sub>10</sub>-CadC mit einem Penta-His-Antikörper detektiert. Dabei zeigten sich bei den Zellen, die bei pH 5,8 angezogen wurden, deutliche C-terminal verkürzte Peptide, die bei den Zellen, die in neutralem Medium kultiviert wurden, fehlten (Abb. 25 A). Allerdings traten diese Peptide nur in der Membranfraktion auf, nicht in der zytoplasmatischen Fraktion.

Um eventuelle Artefakte durch die Überproduktion von CadC zu vermeiden, wurde auch versucht,

chromosomal kodiertes CadC nachzuweisen. Dafür wurden Antikörper gegen gereinigtes His<sub>10</sub>-CadC von einem kommerziellen Anbieter hergestellt. Zwar ließ sich mit diesen polyklonalen Antikörpern überproduziertes CadC in der Membranfraktion nachweisen (Abb. 25 B), doch daneben wurden sowohl im Zytoplasma als auch in der Membranfraktion zahlreiche Proteine unspezifisch detektiert, so dass die Lokalisation von chromosomal kodiertem CadC nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte



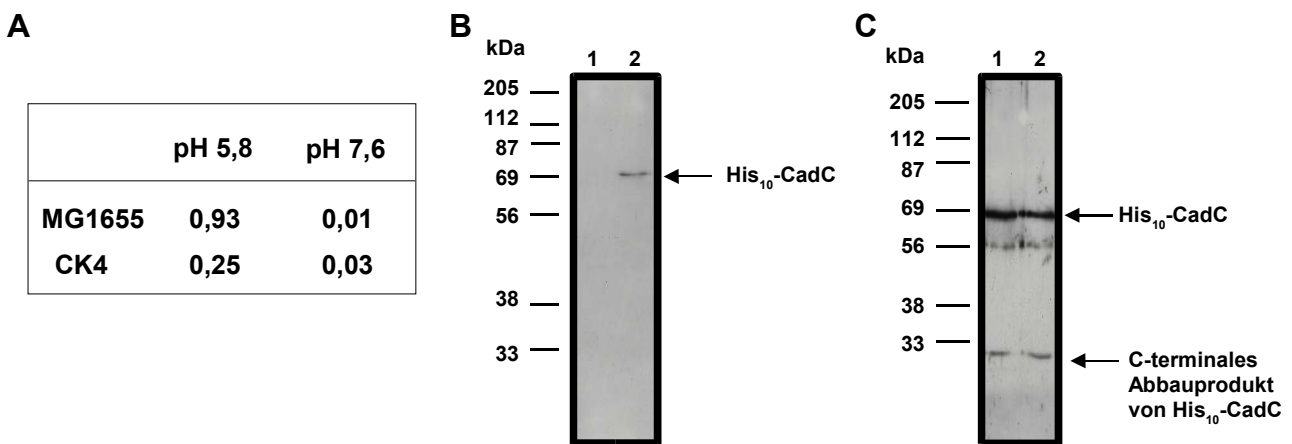
**Abb. 25: Nachweis der abgespaltenen N-terminalen Domäne von His<sub>10</sub>-CadC in Zellfraktionen von *E. coli* nach Kultivierung bei unterschiedlichen pH-Werten**

**A:** Nachweis durch den Penta-His-Antikörper: *E. coli* BL21/pET16b-*cadC* wurde bei pH 5,8 oder pH 7,6 bis zur stationären Phase kultiviert, die Zellen gesammelt und die Zytoplasma- und die Membranfraktion präpariert. Die Fraktionen wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und die Lokalisation der N-terminalen Domäne analysiert. **Spur 1:** Zytoplasma, pH 5,8 **Spur 2:** Zytoplasma, pH 7,6 **Spur 3:** Membranvesikel, pH 5,8 **Spur 4:** Membranvesikel, pH 7,6.

**B:** Nachweis durch  $\alpha$ -CadC-Antiserum: *E. coli* BL21/pET16b-*cadC* wurde bei pH 5,8 bis zur stationären Phase kultiviert, die Zellen gesammelt und die zytoplasmatische- und die Membranfraktion präpariert. Die Fraktionen wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und die Lokalisation der N-terminalen Domäne analysiert. **Spur 1:** Zytoplasma **Spur 2:** Membranvesikel

Aus diesem Grund wurde das chromosomale *cadC* des Stamms MG1655 durch das *his<sub>10</sub>-cadC* Allel aus dem Plasmid pET-16b-*cadC* ersetzt. Der neu konstruierte Stamm wurde als *E. coli* CK4 bezeichnet. Wie bereits gezeigt werden konnte, weist das plasmidkodierte His<sub>10</sub>-CadC Derivat *in vivo* Wildtyp-Aktivität auf (Küper, 2001). Nachdem *his<sub>10</sub>-cadC* auf das Chromosom transferiert worden war, wurde zunächst die Funktionalität des His<sub>10</sub>-CadC Derivats überprüft. Als indirektes Maß für die Funktionalität wurde die *cadBA*-Expression in Zellen vom Wildtypstamm MG1655 und im Stamm CK4 bestimmt, indem die Aktivität der Lysin-Decarboxylase CadA in Zellextrakten

gemessen wurde. Der Wildtyp MG1655 zeigte eine spezifische Aktivität von ca. 0,9 Units/ $\mu\text{g}$  bei Kultivierung unter induzierenden Bedingungen, und eine nicht messbare Aktivität bei Kultivierung unter nicht-induzierenden Bedingungen. *E. coli* CK4 zeigte ebenfalls sehr geringe CadA-Aktivitäten, wenn die Zellen unter nicht-induzierenden Bedingungen angezogen wurden. Bei Kultivierung unter induzierenden Bedingungen wurde eine spezifische CadA-Aktivität von ca. 0,25 Units/ $\mu\text{g}$  gemessen (Abb. 26 A).



**Abb. 26: Aktivität und Lokalisation von His<sub>10</sub>-CadC in *E. coli* CK4**

**A:** Spezifische CadA-Aktivität in MG1655 und CK4: *E. coli* MG1655 (Wildtyp) und *E. coli* CK4 (chromosomales *his<sub>10</sub>-cadC*) wurden unter induzierenden (LB-Medium, pH 5,8) oder nicht-induzierenden Bedingungen (LB-Medium, pH 7,6) bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und die CadA-Aktivität in Zellextrakten bestimmt. Die CadA-Aktivität in den Extrakten stellt ein indirektes Maß für die *cadBA*-Expression dar. Die angegebenen Mittelwerte beruhen auf mindestens zwei unabhängigen Messungen.

**B:** Immunologischer Nachweis von His<sub>10</sub>-CadC in Zellextrakten aus CK4: *E. coli* CK4 wurde bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und dann für 15 min induzierenden Bedingungen (LB-Medium, pH 5,8, anaerob) ausgesetzt. Anschließend wurden Zytoplasma und die Membranfraktion präpariert, die Fraktionen per SDS-PAGE aufgetrennt und die Lokalisation der N-terminalen Domäne mit dem Penta-His-Antikörper detektiert. **Spur 1:** Zytoplasma **Spur 2:** Membranvesikel

**C:** Nachweis von His<sub>10</sub>-CadC in CK4 nach Kultivierung bei unterschiedlichen pH-Werten: *E. coli* CK4 wurde bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und dann für 15 min induzierenden (LB-Medium, pH 5,8, anaerob) oder nicht-induzierenden (LB-Medium, pH 7,6, aerob) Bedingungen ausgesetzt. Anschließend wurden die Membranfraktionen präpariert, solubilisiert und His<sub>10</sub>-CadC wie unter 2.5.1 beschrieben ankonzentriert. Die Eluate wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und die N-terminale Domäne mit dem Penta-His-Antikörper detektiert. **Spur 1:** Ankonzentriertes His<sub>10</sub>-CadC aus CK4 bei induzierenden Bedingungen **Spur 2:** Ankonzentrierte His<sub>10</sub>-CadC aus CK4 bei nicht-induzierenden Bedingungen

Die CadA-Aktivität in CK4 war zwar deutlich geringer als beim Wildtyp MG1655, aber generell schien das His<sub>10</sub>-CadC-Derivat nach wie vor zu einer Reizwahrnehmung wie Wildtyp-CadC und auch zur Aktivierung der *cadBA*-Expression in der Lage zu sein, da die *cadBA*-Expression unter induzierenden Bedingungen wesentlich stärker war als unter nicht-induzierenden Bedingungen.

Um die Lokalisation von chromosomal-kodiertem His<sub>10</sub>-CadC zu überprüfen, wurden die Zellen

zunächst bei neutralem pH-Wert bis zu mittleren logarithmischen Wachstumsphase kultiviert, für 15 min induzierenden (LB-Medium, pH 5,8; anaerob) oder nicht-induzierenden Bedingungen (LB-Medium, pH 7,6; aerob) ausgesetzt, und dann durch Zentrifugation gesammelt. Die Bedingungen wurden so gewählt, weil die in 3.4 beschriebenen Experimente gezeigt hatten, dass aktives CadC nur für wenige Minuten in der Lage ist, die *cadBA*-Expression zu aktivieren, ein eventuell "aktives" lösliches Peptid würde also nur für kurze Zeit nach Beginn der Induktion vorliegen. Anschließend wurden die Zytoplasma- und die Membranfraktion der Zellen präpariert, durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und die Lokalisation von His<sub>10</sub>-CadC mittels Penta-His-Antikörper untersucht. Dabei zeigte sich in der Membranfraktion der Zellen eine distinkte Bande in Höhe von ca. 65 kDa, die dem nicht-gespaltenen His<sub>10</sub>-CadC entsprach (Abb. 26 B).

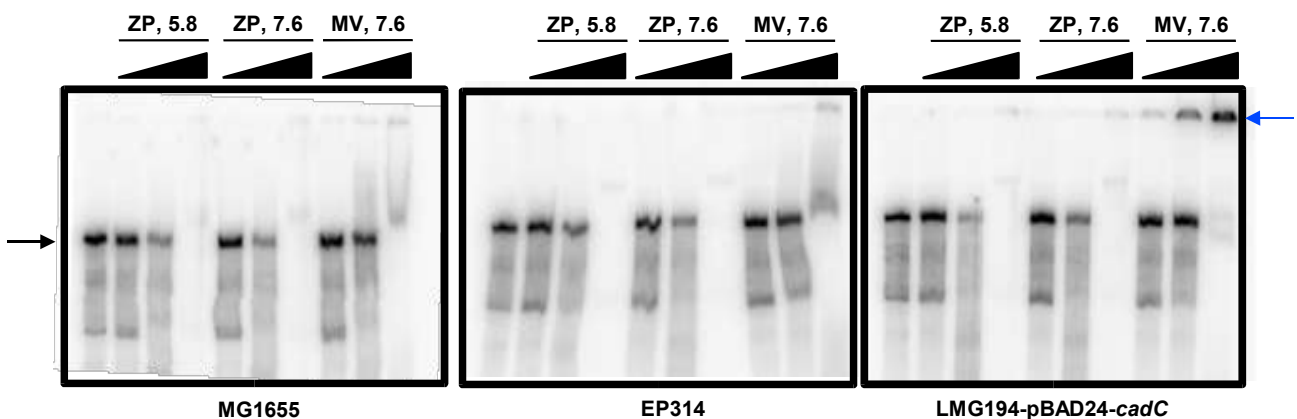
Um ein stärkeres Signal zu erhalten, wurden beide Fraktionen über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie wie unter 2.5.1 beschrieben ankonzentriert, um auch geringe Mengen an CadC detektieren zu können. Auch durch diese Prozedur konnte kein CadC-Fragment im Zytoplasma sichtbar gemacht werden (nicht gezeigt). In der Membranfraktion dagegen konnten schwache Banden detektiert werden, deren Laufhöhe der des beschriebenen C-terminalen verkürzten Peptids entsprach (Abb. 26 C). Das Auftreten des Peptids konnte aber nicht mit den Inkubationsbedingungen korreliert werden, d. h. das Peptid trat sowohl bei Zellen auf, die bei induzierenden Bedingungen inkubiert worden waren, als auch bei Zellen, die bei nicht-induzierenden Bedingungen inkubiert worden waren.

Eine andere Strategie war, eine eventuell abgespaltene N-terminale Domäne von CadC durch die Bindung an ein DNA-Fragment mit der Sequenz des *cadBA*-Promotors (entsprach der DNA-Sequenz von bp -150 bis +72 der *cadBA*-Promotorregion) zu detektieren. Für das Experiment wurden Zellen der Stämme LMG194/pBAD24-*cadC*, in dem His<sub>10</sub>-CadC überproduziert wurde, MG1655 als Wildtyp und EP314 ( $\Delta cadC$ ) als Negativkontrolle zunächst bei neutralem pH-Wert kultiviert, und dann für 15 min induzierenden (pH 5,8; anaerob) oder nicht-induzierenden Bedingungen (pH 7,6; aerob) ausgesetzt. Gelretardationsexperimente wurden mit verschiedenen Mengen Gesamtprotein der Zytoplasma- und der Membranfraktionen durchgeführt. Eine signifikante DNA-Bindung, die auf das Vorhandensein der DNA-bindenden Domäne hinweist, konnte nur in der Membranfraktion von LMG194/pBAD24-*cadC* beobachtet werden (Abb. 27).

Ein leichter Shift der DNA bei Einsatz von 10  $\mu$ g Gesamtprotein aus dem Zytoplasma war in allen Proben zu beobachten. Da dieser Shift auch in der Negativkontrolle EP314 beobachtet werden konnte, war er vermutlich nicht auf CadC sondern eher auf andere DNA-bindende Proteine wie z. B. H-NS oder die RNA-Polymerase zurückzuführen. Starke Nuklease-Aktivitäten in den zytoplasmatischen Fraktionen der Zellen erschwerten die Detektion von Shifts, die möglicherweise



auf CadC zurückzuführen waren.



**Abb. 27: Gelretardationsexperimente mit Zytoplasma- und Membranfraktionen**

*E. coli* LMG194/pBAD24-*cadC* (Überexpression von *cadC*), MG1655 (Wildtyp) und EP314 ( $\Delta cadC$ ) wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und dann für 15 min induzierenden (pH 5,8, anaerob) oder nicht-induzierenden (pH 7,6, aerob) Bedingungen ausgesetzt. Anschließend wurden die Zytoplasma- und die Membranfraktionen präpariert. Mit jeweils 0,1, 1 und 10  $\mu$ g Gesamtprotein (angedeutet durch die schwarzen Dreiecke) der Fraktionen wurden Gelretardationsexperimente wie unter 2.5.6 beschrieben durchgeführt. Der schwarze Pfeil indiziert nicht-gebundene DNA, der blaue Pfeil indiziert durch CadC gebundene DNA. **ZP, 5.8:** Zytoplasmatische Fraktion der Zellen, die induzierenden Bedingungen ausgesetzt wurden. **ZP, 7.6:** Zytoplasmatische Fraktion der Zellen, die nicht-induzierenden Bedingungen ausgesetzt wurden. **MV 7.6:** Membranfraktion der Zellen, die nicht-induzierenden Bedingungen ausgesetzt wurden

### 3.3.2.3 Funktionalität C-terminal verkürzter CadC-Peptide

Nach den Vorhersagen des Proteolysemodells sollte eine lösliche N-terminale Domäne von CadC die *cadBA*-Expression konstitutiv aktivieren. Zur Überprüfung dieser Vorhersage wurde eine Anzahl von C-terminal verkürzten His<sub>10</sub>-CadC-Peptiden hergestellt und ihr Einfluss auf die *cadBA*-Expression getestet werden. Im Rahmen dieser Experimente sollte auch die Bedeutung der Transmembrandomäne und der periplasmatischen Domäne für die Aktivität von CadC analysiert werden.

Das Peptid His<sub>10</sub>-CadC 1-103 umfasste lediglich das DNA-bindende HTH-Motiv von His<sub>10</sub>-CadC, His<sub>10</sub>-CadC 1-159 die gesamte N-terminale Domäne (Abb. 28). Die Peptide His<sub>10</sub>-CadC 1-164 bis einschließlich His<sub>10</sub>-CadC 1-187 enthielten sukzessive Verkürzungen in der Transmembrandomäne. His<sub>10</sub>-CadC 1-215 umfasste neben der N-terminalen- und der Transmembrandomäne noch die ersten 28 Aminosäuren der periplasmatischen Domäne. Alle verkürzten His<sub>10</sub>-CadC-Peptide hatten einen N-terminalen His<sub>10</sub>-Tag und konnten so mit dem Penta-His-Antikörper detektiert werden. Die Gene, die für die His<sub>10</sub>-CadC-Peptide kodierten, wurden in den Expressionsvektor pBAD24 kloniert.

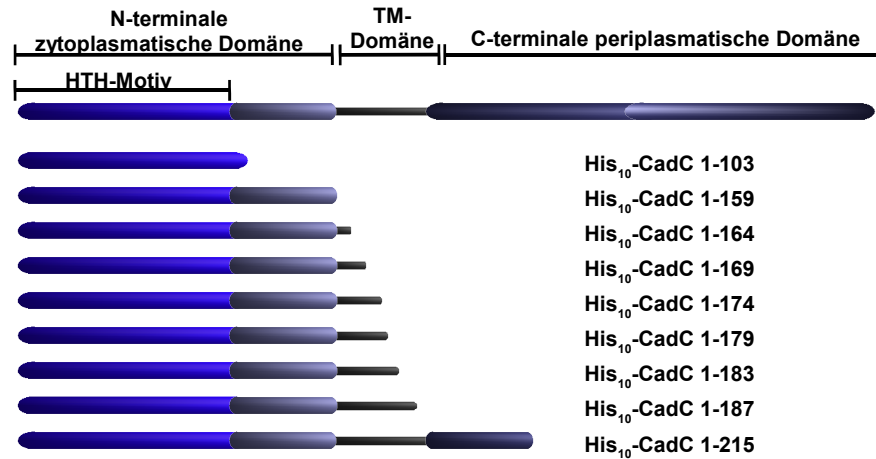


Abb. 28: Schematische Darstellung von C-terminal verkürzten His<sub>10</sub>-CadC-Peptiden

Zunächst wurde die Lokalisation der verschiedenen CadC-Peptide durch Immunoblots mit dem Penta-His-Ak überprüft. His<sub>10</sub>-CadC 1-103 und His<sub>10</sub>-CadC 1-159 konnten ausschließlich im Zytoplasma detektiert werden. His<sub>10</sub>-CadC 1-164 war zu ca. 50% zytoplasmatisch und zu etwa 50% in der Membranfraktion lokalisiert. Alle anderen Peptide waren praktisch ausschließlich in der Membranfraktion lokalisiert (Abb. 29).

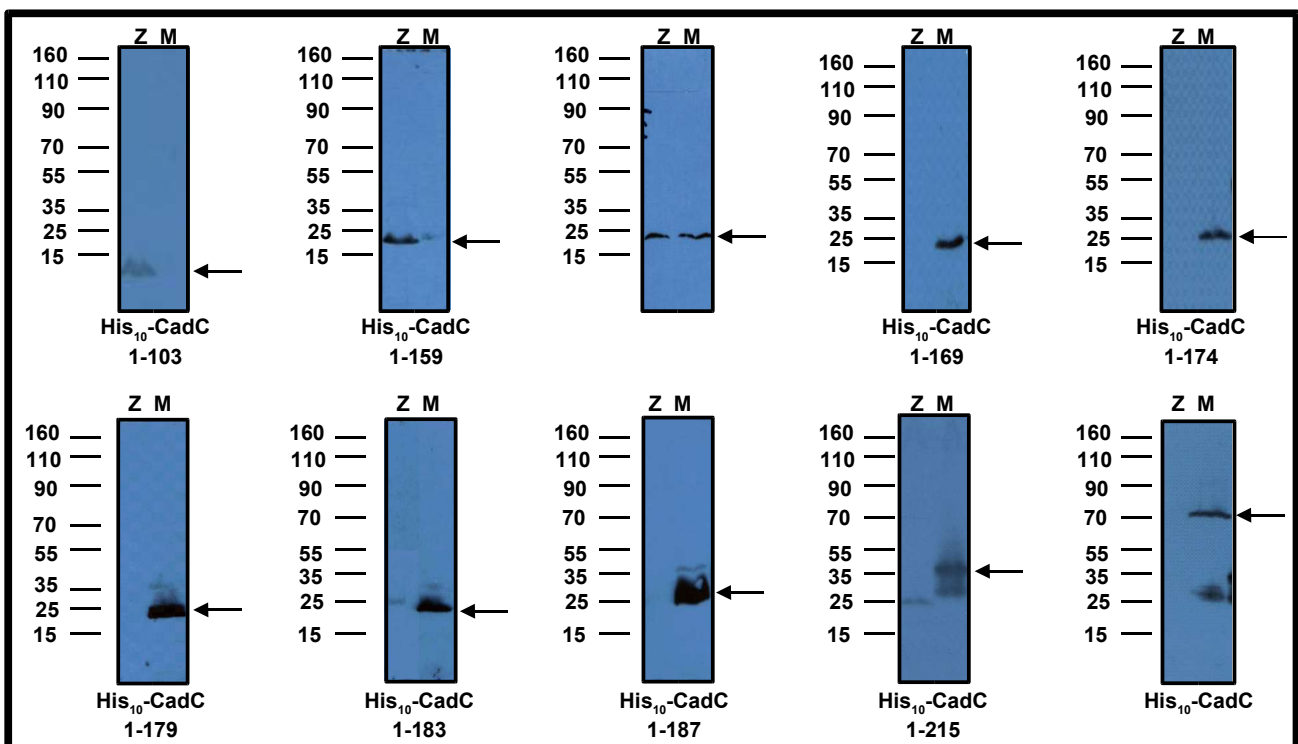


Abb. 29: Lokalisation der verkürzten His<sub>10</sub>-CadC-Derivate

LMG194 wurde mit den Plasmiden pBAD24-*cadC* 1-103, pBAD24-*cadC* 1-159, pBAD24-*cadC* 1-164, pBAD24-*cadC* 1-169, pBAD24-*cadC* 1-174, pBAD24-*cadC* 1-179, pBAD24-*cadC* 1-183, pBAD24-*cadC* 1-187, pBAD24-*cadC* 1-215 und pBAD24-*cadC* transformiert und die transformierten Zellen bis zur stationären Wachstumsphase kultiviert, wobei die Expression der verkürzten *cadC*-Derivate mit 0,2% Arabinose induziert wurde. Anschließend wurden das Zytoplasma und die Membranfraktionen präpariert, und die Fraktionen per SDS-PAGE aufgetrennt. Die Lokalisation der verkürzten CadC-Peptide wurde mit dem Penta-His-Ak detektiert. Z: Zytoplasma M: Membranfraktion

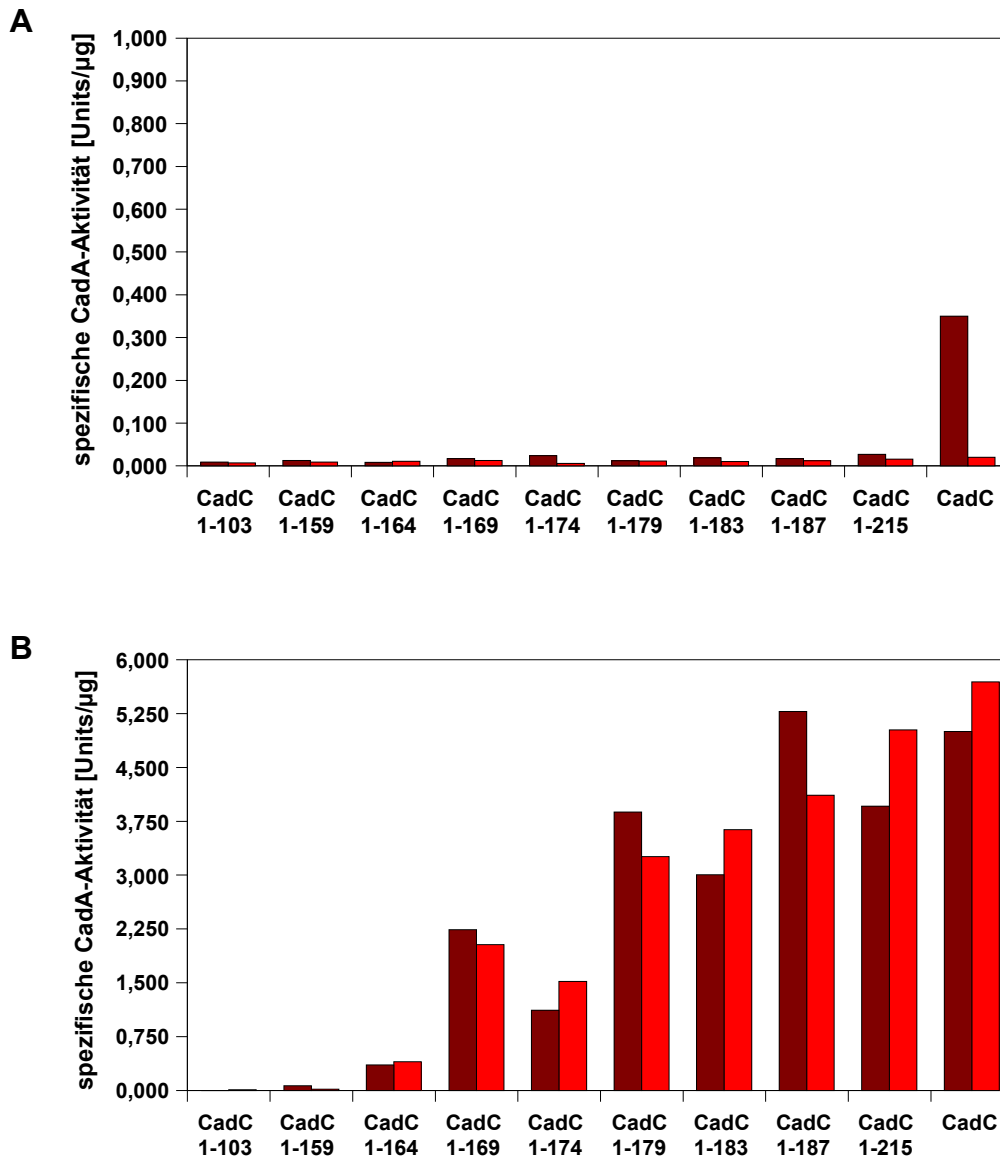
Um die Funktionalität der His<sub>10</sub>-CadC-Peptide zu untersuchen, wurde getestet, ob die C-terminal verkürzten Peptide die *cadBA*-Expression in dem Stamm *E. coli* MG1655- $\Delta cadC$  komplementieren konnten. *E. coli* MG1655- $\Delta cadC$  kann aufgrund einer chromosomale *cadC*-Deletion die *cadBA*-Expression nicht aktivieren. Für die Experimente wurde der Stamm mit den Plasmiden transformiert, die für die verkürzten CadC-Peptide kodierten. Als Maß für die *cadBA*-Expression wurde die Aktivität der Lysin-Decarboxylase CadA in Zellextrakten gemessen. Zum Vergleich wurden die CadA-Aktivitäten in MG1655- $\Delta cadC$ /pBAD24-*cadC* gemessen, in dem pBAD24-*cadC* für ein nicht-verkürztes His<sub>10</sub>-CadC kodierte.

Im Plasmid pBAD24 standen die *cadC*-Derivate unter Kontrolle des P<sub>BAD</sub>-Promotors des *araBAD*-Operons. Ohne Zugabe des Induktors Arabinose kam es in diesen Plasmiden nur zu einer sehr geringen Expression der entsprechenden *cadC*-Derivate. In diesem Fall zeigte MG1655- $\Delta cadC$ /pBAD24-*cadC* das *cadBA*-Expressionsmuster von *E. coli*-Wildtyp, d. h. eine starke *cadBA*-Expression, wenn die Zellen unter induzierenden Bedingungen kultiviert wurden, und eine geringe *cadBA*-Expression, wenn die Zellen unter nicht-induzierenden kultiviert wurden (Abb. 30 A).

Hingegen war unter diesen Bedingungen keines der verkürzten His<sub>10</sub>-CadC-Peptide in der Lage, die *cadBA*-Expression signifikant zu aktivieren, unabhängig davon, ob die Zellen unter induzierenden oder nicht-induzierenden Bedingungen kultiviert worden waren (Abb. 30 A).

C-terminal verkürzte Peptide unterliegen oftmals einem verstärkten proteolytischen Abbau. Daher konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die verkürzten His<sub>10</sub>-CadC-Derivate in einer zu geringen Kopienzahl vorlagen, um die *cadBA*-Expression zu aktivieren. Aus diesem Grund wurden die Experimente wiederholt und die Expression der *cadC*-Derivate durch Zugabe des Induktors Arabinose verstärkt. In diesem Fall wurde in MG1655- $\Delta cadC$ /pBAD24-*cadC* eine sehr starke, konstitutive *cadBA*-Expression induziert (Abb. 30 B). Die verkürzten, membranlokalisierten Peptide His<sub>10</sub>-CadC 1-169, His<sub>10</sub>-CadC 1-174, His<sub>10</sub>-CadC 1-179, His<sub>10</sub>-CadC 1-183, His<sub>10</sub>-CadC 1-187 und His<sub>10</sub>-CadC 1-215 induzierten ebenfalls eine starke, konstitutive *cadBA*-Expression (Abb. 30 B). Auch das teils membranlokalisierte, teils zytoplasmatische Peptid His<sub>10</sub>-CadC 1-164 war unter diesen Bedingungen in der Lage, eine konstitutive *cadBA*-Expression zu aktivieren, allerdings deutlich schwächer als die anderen membranlokalisierten Peptide.

Die zytoplasmatischen Peptide His<sub>10</sub>-CadC 1-103 und His<sub>10</sub>-CadC 1-159 konnten auch bei verstärkter Synthese weder unter induzierenden noch unter nicht-induzierenden Bedingungen die *cadBA*-Expression aktivieren (Abb. 30 B).



**Abb. 30: Komplementation der *cadBA*-Expression in *MG1655-ΔcadC* durch C-terminal verkürzte CadC-Derivate**

*E. coli* *MG1655-ΔcadC* wurde mit den Plasmiden *pBAD24-cadC* 1-103, *pBAD24-cadC* 1-159, *pBAD24-cadC* 1-164, *pBAD24-cadC* 1-169, *pBAD24-cadC* 1-174, *pBAD24-cadC* 1-179, *pBAD24-cadC* 1-183, *pBAD24-cadC* 1-187, *pBAD24-cadC* 1-215 und *pBAD24-cadC* transformiert, unter induzierenden (■) (LB-Medium, pH 5,8) oder nicht-induzierenden Bedingungen (■) (LB-Medium, pH 7,6) bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und die CadA-Aktivität in Zellextrakten bestimmt. Die CadA-Aktivität stellt ein indirektes Maß für die *cadBA*-Expression dar. Die angegebenen Mittelwerte beruhen auf mindestens zwei unabhängigen Messungen.

**A:** Komplementation der *cadBA*-Expression, wenn die Expression der Plasmid-kodierten *cadC*-Derivate nicht zusätzlich induziert wurde.

**B:** Komplementation der *cadBA*-Expression, wenn die Expression der Plasmid-kodierten *cadC*-Derivate durch Zugabe von 0,2% Arabinose induziert wurde.

### 3.4 Modellierung des Cad-Systems

Für das Verständnis komplexer Prozesse in der Zelle, hat sich die mathematische Modellierung einzelner biologischer Systeme als ein nützliches Werkzeug erwiesen. Um einen tieferen Einblick in die Regulation des Cad-Systems in *E. coli* und die zelluläre Reaktion auf externen pH-Stress zu erhalten, sollte ein mathematisches Modell erstellt werden, das die Induktion und Aktivität des Cad-Systems während einer Magenpassage beschreibt. Die Magenpassage sollte dann *in vivo* simuliert, die Expression des *cadBA*-Operons und die Aktivität des Cad-Systems experimentell bestimmt und anhand der gewonnenen Daten das mathematische Modell überprüft werden.

Um experimentelle Daten zur Induktion und Aktivität des Cad-Systems zu gewinnen, wurde mit dem *E. coli* Wildtypstamm MG1655 eine Magenpassage simuliert. Um die Bedingungen im Magen zu simulieren, wurde das Medium durch Zugabe von HCl angesäuert und durch Belüftung mit einem Mischgas (85% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>) mikroaerophile Bedingungen hergestellt. Von den Zellen und dem Medium wurden laufend Proben genommen und folgende Parameter gemessen:

- ◆ Die *cadBA*-Transkription, bzw. die Konzentration der *cadBA*-mRNA in der Zelle
- ◆ Die Menge der Lysin-Decarboxylase CadA in der Zelle
- ◆ Die Konzentrationen von Lysin und Cadaverin im Medium
- ◆ Der pH-Wert des Mediums
- ◆ Die Gesamtzellzahl und die Lebendzellzahl der Kultur

Anhand der experimentell gewonnenen Daten zur Induktion und Aktivität des Cad-Systems wurde das Modell zur mathematischen Beschreibung des Cad-Systems überprüft. Das Modell wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Eduardo Mendoza, Dr. Ulrich Gerland, Akos Dobay und Georg Fritz vom Institut für Physik der LMU München erstellt. Sämtliche aufgestellten Gleichungen sind im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.

Neben den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten experimentellen Daten wurden für die Modellierung auch auf bereits veröffentlichte Daten zurückgegriffen. Dies waren vor allem für die Aktivität von CadA Sabo *et al.* (1974), für die Aktivität von CadB Soksawatmaekhin *et al.* (2004) und für die transkriptionelle Aktivierung des *cadBA*-Operons Neely und Olson (1996).

#### 3.4.1 Transkription des *cadBA*-Operons

Für transkriptionelle Studien *in vivo* wurde die Gesamt-RNA der Zellen präpariert und die relative Menge des *cadBA*-Transkripts durch Northern-Analysen bestimmt. Die Transkriptionsrate des *cadBA*-Operons stieg unmittelbar nach Beginn der Induktion stark an. Die maximalen Mengen an *cadBA*-Transkript wurden nach ca. 15 min gemessen (Abb. 31). Nach Erreichen dieses Maximums sank die Transkriptmenge sehr schnell wieder ab und erreichte ca. 35 min nach Beginn der

Induktion wieder ein Basallevel.

Die Transkription des *cadBA*-Operons *in silico* beschrieb die Funktion

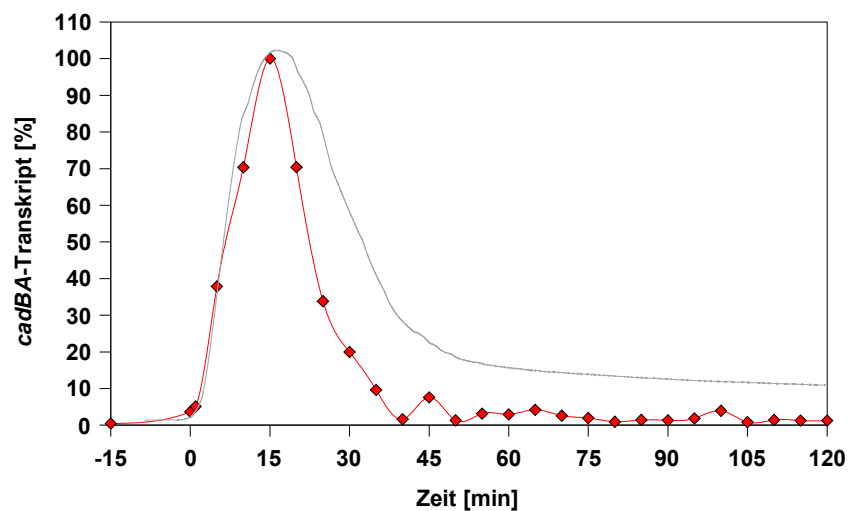
$$\frac{d}{dt}[\text{cadBA}] = \frac{k_7 * [\text{CadC}]^2}{[\text{CadC}]^2 + k_8} - k_9 * [\text{cadBA}]$$

[CadC] gab die Konzentration an aktivem CadC in der Zelle an.

Die Konstante  $k_7$  gab die  $V_{\max}$  der mRNA-Synthese an, der Wert betrug  $0,38 \text{ nM s}^{-1}$ .

Die Konstante  $k_8$  gab die Michaelis-Konstante der mRNA-Synthese an, der Wert betrug  $3 \text{ nM}$ .

Die Konstante  $k_9$  gab die Rate der mRNA-Degradation an, der Wert lag bei  $0,002 \text{ s}^{-1}$ .



**Abb. 31: Transkription des *cadBA*-Operons**

Die rote Linie (—) indiziert die *cadBA*-Transkription während einer simulierten Magenpassage *in vivo*. *E. coli* MG1655 wurde bis zur logarithmischen Wachstumsphase in LB-Medium kultiviert. Zum Zeitpunkt  $T = 0 \text{ min}$  wurde der pH-Wert des Mediums durch Zugabe von HCl auf 5,5 eingestellt und durch Belüften mit Mischgas mikroaerophile Bedingungen geschaffen. Gesamt-RNA wurde wie unter 2.4.8 beschrieben präpariert, die relative Menge an *cadBA*-Transkript wurde durch Northern-Analyse wie unter 2.4.9 beschrieben ermittelt. Der höchste gemessene Wert wurde als 100% definiert.

Die graue Linie (—) indiziert den Verlauf der *cadBA*-Transkription während einer simulierten Magenpassage, wie er anhand des mathematischen Modells des Cad-Systems errechnet wurde.

Die grafische Gegenüberstellung der experimentell determinierten und der vom Modell beschriebenen *cadBA*-Transkription zeigte eine relativ gute Übereinstimmung. Der schnelle Anstieg und der anschließende Abfall der *cadBA*-mRNA-Konzentration konnten sowohl *in vivo* als auch *in silico* beobachtet werden.

### 3.4.2 Expression von *cadA*

Um die relative Menge an CadA in den Zellen *in vivo* zu ermitteln, wurde die Lysin-Decarboxylase-Aktivität von zellfreien Extrakten gemessen. Kurz nach Beginn der Induktion stieg die Menge an CadA in der Zelle an (Abb. 32). Wie erwartet, erfolgte dies mit einigen Minuten Verzögerung im Vergleich zur Transkription. Die CadA-Menge erreichte etwa 30 min nach Beginn der Induktion ein Maximum. Im Gegensatz zur Transkriptmenge blieb die CadA-Kopienzahl auf diesem Niveau und sank nur sehr langsam im Verlauf mehrerer Stunden ein wenig ab.

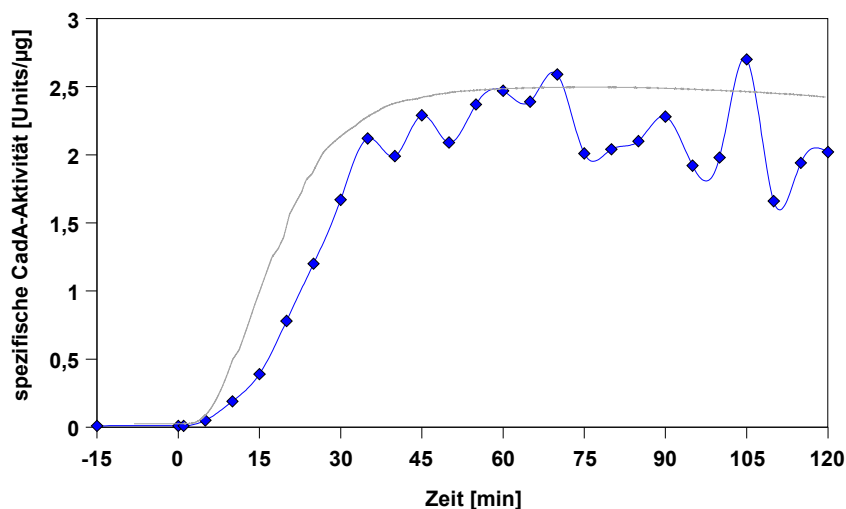
Die Konzentration der Lysin-Decarboxylase CadA in der Zelle *in silico* beschrieb die Funktion

$$\frac{d}{dt} [CadA] = k_{10} * [cadBA] - k_{11} * [CadA]$$

$[cadBA]$  gab die Konzentration an *cadBA*-mRNA an.

Die Konstante  $k_{10}$  beschrieb die *cadA*-Translation, der Wert betrug  $0,022 \text{ s}^{-1}$ .

$k_{11}$  gab den Wert für die CadA-Degradation an, der Wert lag bei  $0,0001 \text{ s}^{-1}$ .



**Abb. 32: Expression von *cadA***

Die blaue Linie (—) indiziert die *cadA*-Expression während einer simulierten Magenpassage *in vivo*. *E. coli* MG1655 wurde bis zur logarithmischen Wachstumsphase in LB-Medium kultiviert. Zum Zeitpunkt  $T = 0 \text{ min}$  wurde der pH-Wert des Mediums durch Zugabe von HCl auf 5,5 eingestellt und durch Belüften mit Mischgas mikroaerophile Bedingungen geschaffen. Die CadA-Aktivität in Zellextrakten stellt ein indirektes Mass für die Kopienzahl von CadA in der Zelle dar. Die graue Linie (—) indiziert den Verlauf der *cadA*-Expression während einer simulierten Magenpassage, wie er anhand des mathematischen Modells des Cad-Systems errechnet wurde.

Die experimentell gemessenen und die modellierten CadA-Konzentrationen stimmten gut überein. Der schnelle initiale Anstieg wurde von dem Modell beschrieben, ebenso wie die konstant bleibende CadA-Konzentration nach etwa 30 min.

### 3.4.3 Extrazelluläre Konzentration von Lysin und Cadaverin

Die Konzentrationen von Lysin und Cadaverin im Medium *in vivo* wurden durch HPLC-Analyse, bzw. für Cadaverin auch durch TNBS-Analyse bestimmt. Wie erwartet, sank die Lysin-Konzentration im Medium während der simulierten Magenpassage ab, während die Cadaverin-Konzentration stieg. Lysin war nach ca. 120 min praktisch nicht mehr messbar (Abb. 33). Die Cadaverin-Konzentration im Medium stieg etwa 10 min nach Beginn der Induktion an (Abb. 34). Nach einer relativ schnellen Zunahme in den ersten 30 min stieg die Konzentration danach eher langsam an und erreichte ca. 70 min nach Beginn der Induktion das Maximum mit etwa 6,5 mM und blieb danach in etwa konstant.

Die Konzentration an extrazellulären Lysin *in silico* wurde durch die Funktion

$$\frac{d}{dt} [lys_{ex}] = -f_{anti} - k_{14} * [LysP] * [lys_{ex}]$$

beschrieben. Die Konzentration an extrazellulären Cadaverin beschrieb die Funktion

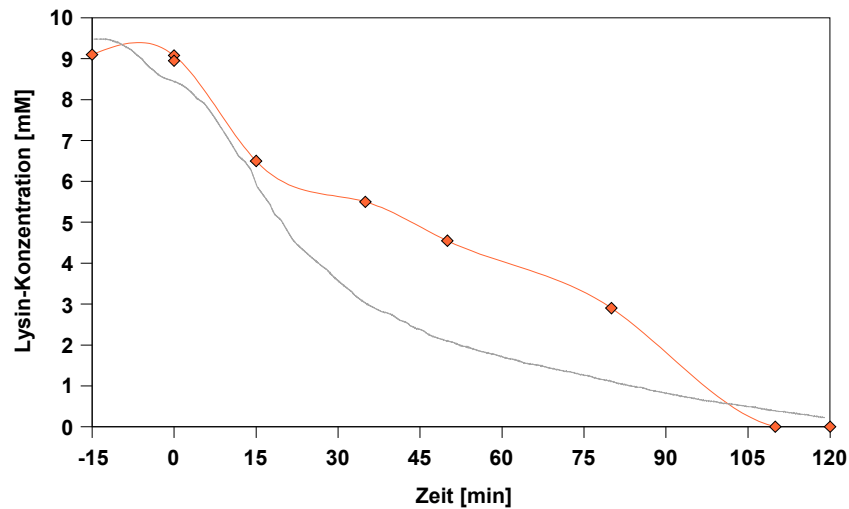
$$\frac{d}{dt} [cad_{ex}] = f_{anti}$$

$f_{anti}$  beschrieb dabei den Substrat-Transport durch den Lysin-Cadaverin Antiporter CadB.

Die Konstante  $k_{14}$  gab die Rate des Lysin-Imports durch die Zelle an. Der Wert betrug  $1,3 * 10^{-5} * s^{-1}$  und war dabei abhängig von  $[LysP]$ , der Konzentration der Lysin-Permease LysP, und von der extrazellulären Lysin-Konzentration.

Die *in vivo* gemessene Abnahme der Lysin-Konzentration wurde von dem *in silico*-Modell ebenso simuliert, wie die Zunahme der Cadaverin-Konzentration

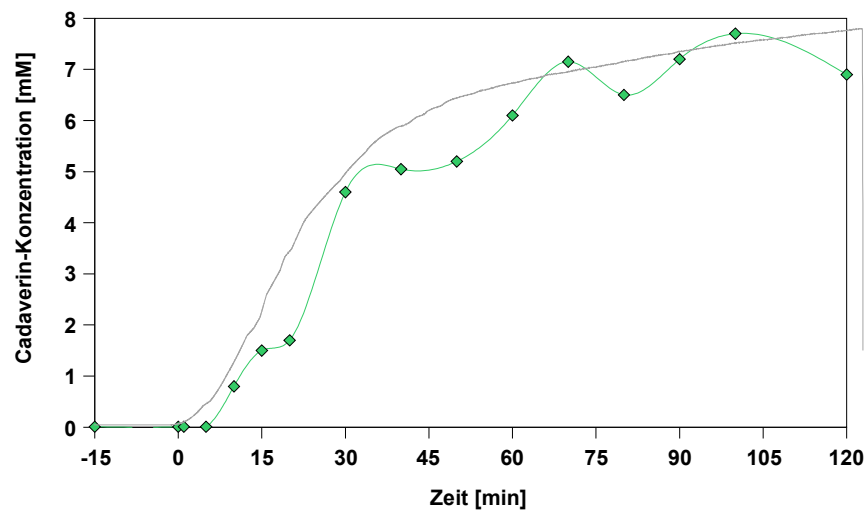




**Abb. 33: Konzentration von Lysin im Medium**

Die orange Linie (—) indiziert die extrazelluläre Lysin-Konzentration während einer simulierten Magenpassage *in vivo*. *E. coli* MG1655 wurde bis zur logarithmischen Wachstumsphase in LB-Medium kultiviert. Zum Zeitpunkt  $T=0$  min wurde der pH-Wert des Mediums durch Zugabe von HCl auf 5,5 eingestellt und durch Belüften mit Mischgas mikroaerophile Bedingungen geschaffen. Die Lysin-Konzentration wurden durch HPLC-Analyse wie unter 2.5.10 beschrieben bestimmt.

Die graue Linie (—) indiziert den zeitlichen Verlauf der extrazellulären Lysin-Konzentration während einer simulierten Magenpassage, wie er anhand des mathematischen Modells des Cad-Systems errechnet wurde.



**Abb. 34: Konzentration von Cadaverin im Medium**

Die grüne Linie (—) indiziert die extrazellulären Cadaverin-Konzentration während einer simulierten Magenpassage *in vivo*. *E. coli* MG1655 wurde bis zur logarithmischen Wachstumsphase in LB-Medium kultiviert. Zum Zeitpunkt  $T=0$  min wurde der pH-Wert des Mediums durch Zugabe von HCl auf 5,5 eingestellt und durch Belüften mit Mischgas mikroaerophile Bedingungen geschaffen. Die Konzentrationen wurden durch HPLC-Analyse, bzw. durch TNBS-Analyse wie unter 2.5.10 beschrieben bestimmt.

Die graue Linie (—) indiziert den zeitlichen Verlauf der extrazellulären Cadaverin-Konzentration während einer simulierten Magenpassage, wie er anhand des mathematischen Modells des Cad-Systems errechnet wurde.

### 3.4.4 pH-Wert des Mediums

Zugleich mit der Cadaverin-Konzentration stieg auch der pH-Wert des Mediums *in vivo* kontinuierlich an, und erreichte ca. 60 min nach Beginn der Induktion einen Wert von etwa 5,8 und blieb anschließend relativ konstant (Abb. 35).

Den pH-Wert des Mediums *in silico* beschrieb die Funktion

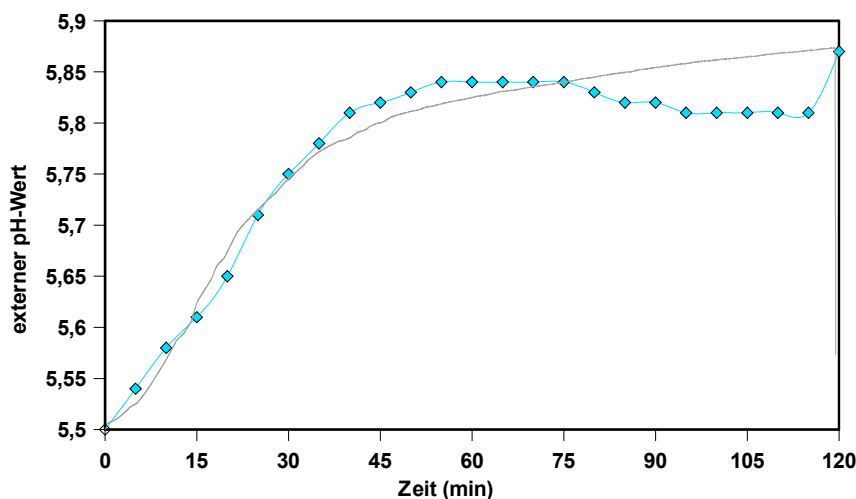
$$\frac{d}{dt}[H_{ex}^+] = -f_{anti} - k_3[H_{ex}^+]^2[CadC]$$

$[H_{ex}^+]$  gab die extrazelluläre  $H^+$ -Ionen-Konzentration an.

$f_{anti}$  beschrieb den Substrat-Transport durch den Lysin-Cadaverin Antiporter CadB.

$[CadC]$  gab die Menge an aktivem CadC an.

Die konstante  $k_3$  beschrieb die Aktivierung von CadC durch extrazelluläre  $H^+$ -Ionen, der Wert betrug  $10^{-7} \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .



**Abb. 35: Zeitlicher Verlauf des pH-Wertes im Medium**

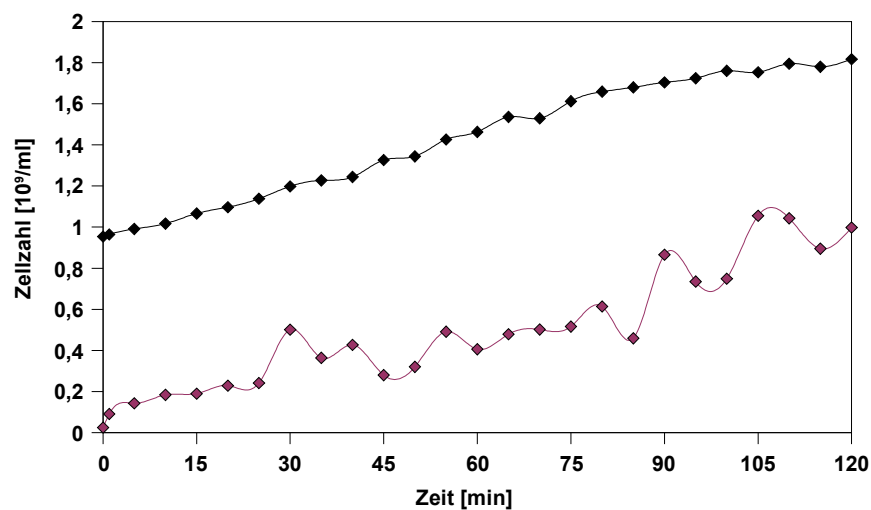
Die türkise Linie (—) indiziert den extrazellulären pH-Wert während einer simulierten Magenpassage *in vivo*. *E. coli* MG1655 wurde bis zur logarithmischen Wachstumsphase in LB-Medium kultiviert. Zum Zeitpunkt  $T=0$  min wurde der pH-Wert des Mediums durch Zugabe von HCl auf 5,5 eingestellt und durch Belüften mit Mischgas mikroaerophile Bedingungen geschaffen. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf des pH-Wertes des Mediums, der während des Versuchs ständig durch eine pH-Elektrode gemessen wurden.

Die graue Linie (—) indiziert den zeitlichen Verlauf des extrazellulären pH-Wertes während einer simulierten Magenpassage, wie er anhand des mathematischen Modells des Cad-Systems errechnet wurde.

Der Anstieg des externen pH-Wertes *in vivo* stimmte relativ gut mit dem von dem *in silico*-Modell beschriebenen Anstieg des pH-Wertes überein.

### 3.4.5 Gesamtzellzahl und Lebendzellzahl der Kultur *in vivo*

Die Gesamtzellzahl der Kultur *in vivo* wurde durch Messen der Absorption bei 600 nm ermittelt, zugrunde gelegt wurde dabei bei einer  $OD_{600} = 1$  eine Zellzahl von  $10^9$ /ml. Die LZZ wurde durch Ausplattieren von seriellen Verdünnungen der Bakterienkultur auf LB-Agarplatten ermittelt. Die Gesamtzellzahl der Kultur und die LZZ stieg während des Versuchs langsam aber kontinuierlich an (Abb. 36). Die Generationszeit der Zellen lag bei ca. 120 min, die  $OD_{600}$  erreichte zum Schluss einen Wert von etwa 1,8. Der Anteil der teilungsfähigen Zellen lag dabei zwischen 20% und 60%.



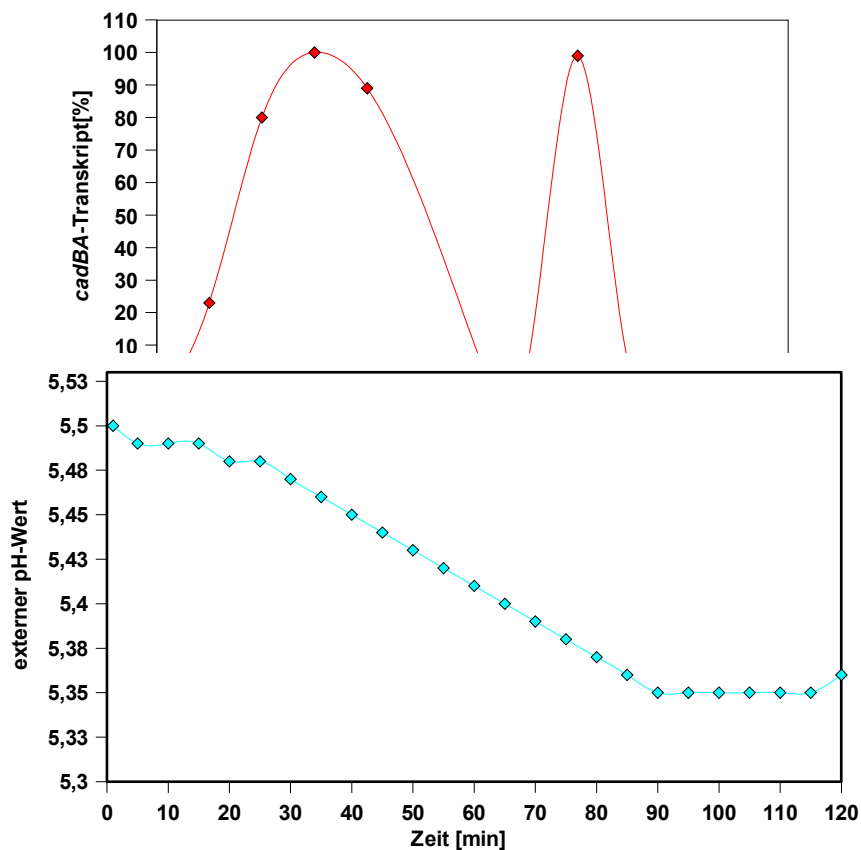
**Abb. 36: Zeitlicher Verlauf der Gesamtzellzahl und Lebendzellzahl bei *E. coli* MG1655**

*E. coli* MG1655 wurde bis zur logarithmischen Wachstumsphase in LB-Medium kultiviert. Zum Zeitpunkt  $T = 0$  min wurde der pH-Wert des Mediums durch Titration mit HCl auf 5,5 eingestellt und durch Belüften mit Mischgas mikroaerophile Bedingungen geschaffen. Die Gesamtzellzahl (—) wurde durch Messen der Absorption bei 600 nm ermittelt, zugrunde gelegt wurde dabei bei einer  $OD_{600} = 1$  eine Zellzahl von  $10^9$ /ml. Die Lebendzellzahl (LZZ) (—) wurde durch Ausplattieren von seriellen Verdünnungen der Bakterienkultur auf LB-Agarplatten ermittelt.

### 3.4.6 Untersuchungen zur Inhibition der *cadBA*-Transkription unter induzierenden Bedingungen

Bei Betrachtung der *cadBA*-Transkription fiel vor allem der starke Abfall der *cadBA*-Transkriptmenge nach ca. 20 min auf. Obwohl nach wie vor induzierende Bedingungen herrschten, fand keine weitere *cadBA*-Transkription statt. Diese zunächst überraschende Beobachtung wurde auch bereits von Neely *et al.* (1996) gemacht. Als möglicher Grund dafür wurde eine Inaktivierung des Regulators CadC durch steigende Konzentrationen an extrazellulären Cadaverin betrachtet.

Um zu testen, ob durch das Entfernen des Cadaverins eine erneute Aktivierung der *cadBA*-Transkription möglich war, wurden 20 min nach Beginn der Induktion mit Hilfe eines Sartorius-Zellkonzentrators die Zellen vom Medium abgeschieden und in neuem LB-Medium (pH 5,5) resuspendiert. Nach Resuspendieren in dem neuen Medium zeigte sich eine erneute Aktivierung der *cadBA*-Transkription, die nach kurzer Zeit ebenfalls wieder stark abfiel (Abb. 37).



**Abb. 37: Einfluss des Mediums auf die Inhibition der *cadBA*-Transkription**

*E. coli* MG1655 wurde bis zur logarithmischen Wachstumsphase in LB-Medium kultiviert. Zum Zeitpunkt T= 0 min

wurde der pH-Wert des Mediums durch Titration mit HCl auf 5,5 eingestellt und durch Belüften mit Mischgas mikroaerophile Bedingungen geschaffen. Nach 20 min wurden die Zellen gesammelt und in frischem LB-Medium (pH 5,5) resuspendiert. Gesamt-RNA wurde wie unter 2.4.8 beschrieben präpariert, die relative Menge an *cadBA*-Transkript wurde durch Northern-Analyse wie unter 2.4.9 beschrieben ermittelt. Der höchste gemessene Wert wurde als 100% definiert.

### 3.5 Untersuchungen zur Funktion des Cad-Systems

Die genaue physiologische Funktion des Cad-Systems ist bislang nicht eindeutig geklärt. Aufschluss über die Funktion könnte eine phänotypische Charakterisierung von Zellen ohne ein funktionsfähiges Cad-System erbringen, die bisher nur spärlich durchgeführt wurde (Soksawatmaekhin *et al.*, 2004). Für eine genauere Charakterisierung des Cad-Systems wurde die Überlebensrate von *E. coli*-Wildtp und einer Cad-negativen Mutante sowohl bei gemäßigttem Säurestress als auch bei extremen Säurestress verglichen. Insbesondere der Einfluss des ausgeschleusten Cadaverins wurde analysiert.

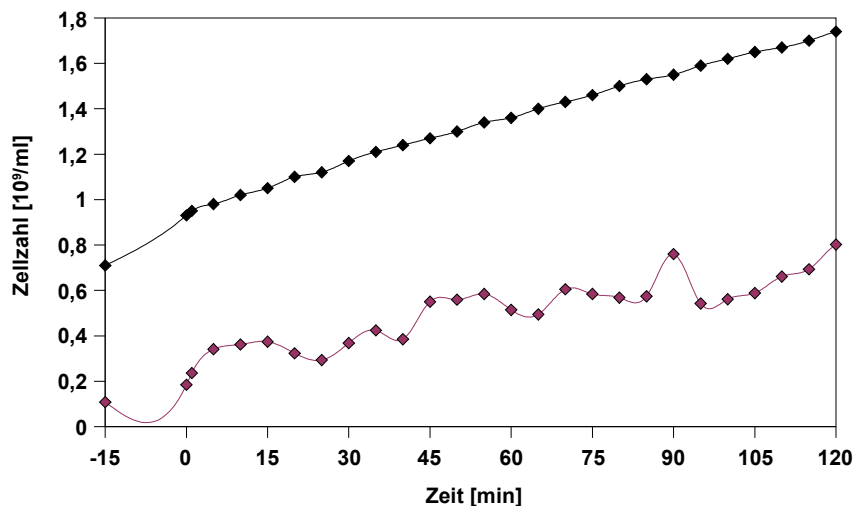
#### 3.5.1 Funktion des Cad-Systems bei gemäßigttem Säurestress

Um die Funktion des Cad-Systems bei gemäßigttem Säurestress zu untersuchen, wurde eine simulierte Magenpassage wie in 3.4 beschrieben auch mit dem Stamm MG1655- $\Delta cadC$  durchgeführt. Aufgrund der *cadC*-Deletion war dieser Stamm nicht in der Lage, das *cadBA*-Operon zu aktivieren. Da es daher nicht zur Produktion und zum Export von Cadaverin kommen konnte, wurde bei diesem Versuch nur der pH-Wert des Mediums, die Gesamtzellzahl und die Lebendzellzahl der Kultur ermittelt. Im Gegensatz zu Wildtypzellen sank nach Beginn der Induktion der pH-Wert des Mediums kontinuierlich weiter ab (Abb. 38). Nach ca. 90 min wurde ein pH-Wert von 5,35 gemessen. Anschließend blieb der externe pH bei diesem Wert relativ stabil.

**Abb. 38: Zeitlicher Verlauf des pH-Wertes im Medium bei MG1655- $\Delta cadC$**

*E. coli* MG1655-*cadC* wurde bis zur logarithmischen Wachstumsphase in LB-Medium kultiviert. Zum Zeitpunkt T= 0 min wurde der pH-Wert des Mediums durch Titration mit HCl auf 5,5 eingestellt und durch Belüften mit Mischgas mikroaerophile Bedingungen geschaffen. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf des pH-Wertes des Mediums, der während des Versuchs ständig durch eine pH-Elektrode gemessen wurden.

Es konnte jedoch keine signifikante Beeinflussung der Gesamtzellzahl und der Lebendzellzahl der Kultur beobachtet werden (Abb. 39). Beide Werte entsprachen in etwa denen, wie sie für den Wildtyp MG1655 gemessen wurden (vergleiche Abb. 36).



**Abb. 39: Zeitlicher Verlauf der Gesamtzellzahl und Lebendzellzahl bei *E. coli* MG1655- $\Delta$ cadC**

*E. coli* MG1655- $\Delta$ cadC wurde bis zur logarithmischen Wachstumsphase in LB-Medium kultiviert. Zum Zeitpunkt  $T=0$  min wurde der pH-Wert des Mediums durch Titration mit HCl auf 5,5 eingestellt und durch Belüften mit Mischgas mikroaerophile Bedingungen geschaffen. Die Gesamtzellzahl (—) wurde durch Messen der Absorption bei 600 nm ermittelt, zugrunde gelegt wurde dabei bei einer  $OD_{600} = 1$  eine Zellzahl von  $10^9$ /ml. Die Lebendzellzahl (LZZ) (—) wurde durch Ausplattieren von seriellen Verdünnungen der Bakterienkultur auf LB-Agarplatten ermittelt.

### 3.5.2 Funktion des Cad-Systems bei extremen Säurestress

Da bei gemäßigttem Säurestress kein Überlebensvorteil von *E. coli*-Wildtyp im Vergleich zu einer Cad-negativen Mutante beobachtet werden konnte, sollte untersucht werden, ob das Cad-System der Zelle einen Überlebensvorteil bei einem extremen Säurestress bei pH 3 bieten könnte.

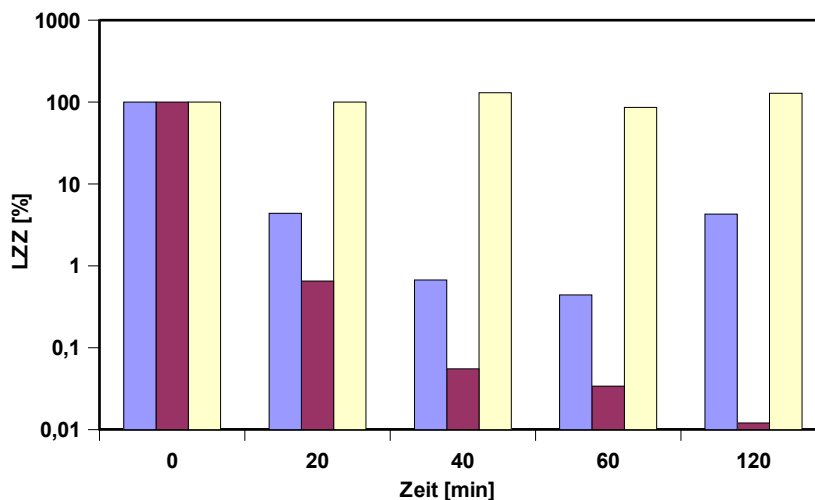
#### 3.5.2.1 Überlebensrate von MG1655 und MG1655- $\Delta$ cadC bei extremen Säurestress

Zellen *E. coli* MG1655 (Wildtyp) und *E. coli* MG1655- $\Delta$ cadC (Cad-negativ) wurden zunächst in LB-Medium bei einem pH-Wert von  $\sim 7$  bis zur mittleren exponentiellen Wachstumsphase kultiviert und dann für 30 min bei pH 5.8 adaptiert, um die Expression des *cadBA*-Operons in MG1655 zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation gesammelt und in LB-Medium mit einem pH von 3 resuspendiert. Die LZZ wurde zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.

Sowohl beim Wildtyp als auch bei der Cad-negativen Mutante zeigte sich nach 20 min eine deutlich verringerte Überlebenswahrscheinlichkeit, wobei aber die LZZ des Wildtyps mit 4,4% (im

Vergleich zum Zeitpunkt 0 min) deutlich höher lag als die der Cad-negative Mutante mit 0,6% (Abb. 40). Im weiteren zeitlichen Verlauf sank die Überlebenswahrscheinlichkeit in beiden Kulturen weiter ab, wobei die LZZ des Wildtyps stets etwa um einen Faktor 10 höher lag als die der Mutante. Nach 120 min lag die LZZ des Wildtyps wieder bei 4,3%, während die der Mutante weiter auf 0,01% gesunken war. Der pH-Wert des Mediums wurde nach 120 min bestimmt, er lag für MG1655 bei pH 3,31 und für MG1655- $\Delta cadC$  bei 3,22.

Die deutlich verringerte Überlebenswahrscheinlichkeit der Cad-negativen Mutante konnte verbessert werden, wenn diese während der Adaption und der Inkubation bei pH 3 mit 10 mM Cadaverin supplementiert wurde. Unter diesen Bedingungen blieb die Lebendzellzahl während des gesamten Versuchs stabil (Abb. 40). Es muss deutlich herausgestellt werden, dass bei dem gewählten Versuchsaufbau die zusätzlich mit Cadaverin supplementierten MG1655- $\Delta cadC$ -Zellen tatsächlich nicht bei pH 3 inkubiert wurden. Das LB-Medium wurde zunächst auf pH 3 eingestellt, und erst anschließend Cadaverin zugegeben. Daher lag der pH-Wert am Anfang der Inkubation bei 3,6, nach 120 min lag er bei 4,5.

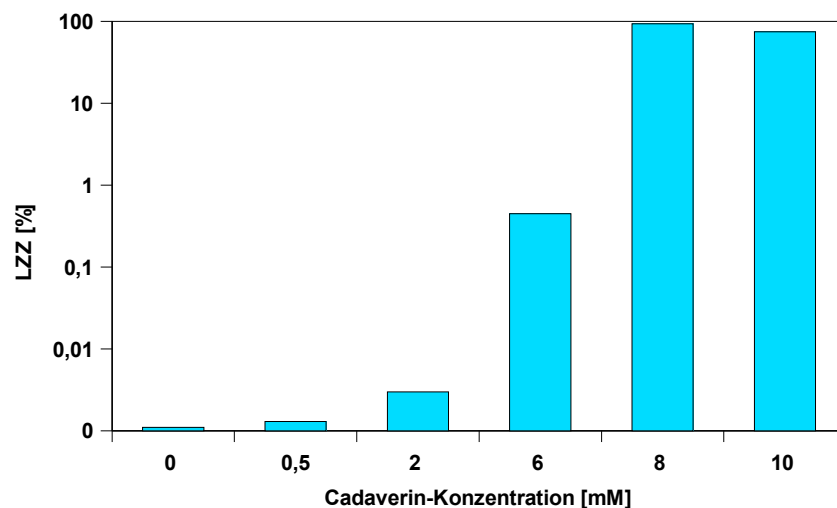


**Abb. 40: Überlebensrate von *E. coli*-Wildtyp und einer Cad-negativen Mutante bei extremen Säurestress**

Zellen von *E. coli* MG1655 (Wildtyp) (■) oder *E. coli* MG1655- $\Delta cadC$  (■) der logarithmischen Wachstumsphase wurden für 30 min in LB-Medium bei pH 5,8 adaptiert und anschließend in LB-Medium bei pH 3 inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die LZZ durch Ausplattieren auf LB-Agar-Platten ermittelt. Die LZZ unmittelbar nach Beginn der Inkubation bei pH 3 (0 min) wurde als 100% definiert. Derselbe Versuch wurde auch mit MG1655- $\Delta cadC$  Zellen durchgeführt, die während der Adaptions- und Inkubationsphase mit 10 mM Cadaverin supplementiert wurden (■).

### 3.5.2.2 Einfluss von Cadaverin auf die Überlebensrate bei extremen Säurestress

Um den Einfluss von Cadaverin auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Zellen differenzierter zu untersuchen, wurden Zellen vom Stamm MG1655- $\Delta cadC$  wie im obigen Versuch beschrieben erst bei neutralem pH kultiviert, dann für 30 min adaptiert und schließlich für 120 min bei pH 3 inkubiert. Dabei wurden die Zellen während der Adaption und der Inkubation mit verschiedenen Cadaverin-Konzentrationen supplementiert. Nach 120 min wurde die LZZ durch Ausplattieren bestimmt. Bis zu einer Konzentration von 2 mM Cadaverin war nur ein geringer Überlebensvorteil zu beobachten (Abb. 41). Ab einer Konzentration von 6 mM gab es eine signifikant erhöhte Überlebenswahrscheinlichkeit, und ab einer Konzentration von 8 mM lag die LZZ bei etwa 100% der Ursprünglichen, vor der Inkubation bei pH 3.



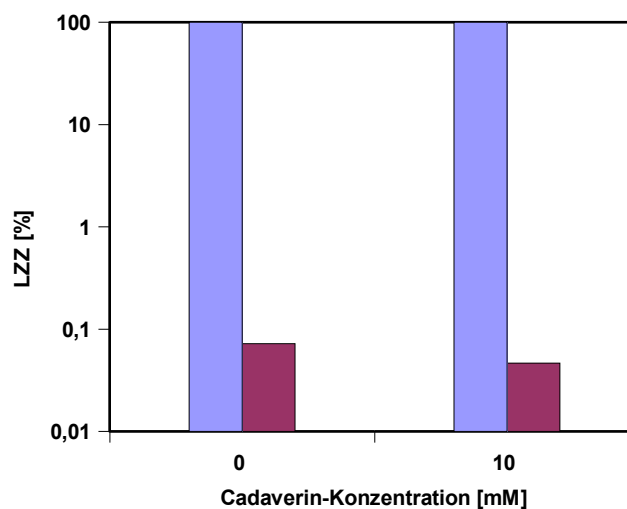
**Abb. 41: Einfluss der externen Cadaverin-Konzentration auf die Überlebensrate**

Zellen *E. coli* MG1655- $\Delta cadC$  der logarithmischen Wachstumsphase wurden für 30 min in LB-Medium bei pH 5,8 adaptiert und anschließend in LB-Medium bei pH 3 inkubiert. Während der Adaptions- und Inkubationsphase wurden die Zellen mit Cadaverin in den angegebenen Konzentrationen supplementiert. 120 min nach Beginn der Inkubation wurde die LZZ durch Ausplattieren auf LB-Agar-Platten ermittelt. Die LZZ unmittelbar nach Beginn der Inkubation bei pH 3 wurde als 100% definiert (nicht dargestellt).



### 3.5.2.3 Wirkungsweise von Cadaverin bei extremen Säurestress

In den oben beschriebenen Versuchen wurde durch die Supplementation mit Cadaverin natürlich auch der pH-Wert des (nicht gepufferten) Mediums verändert. Um herauszufinden, ob der positive Einfluss von Cadaverin auf die LZZ nach einem Säureschock nur auf die Erhöhung des externen pH-Wertes oder möglicherweise auf andere Faktoren zurückzuführen war, wurde der Effekt von Cadaverin auf den pH-Wert durch zusätzliche Zugabe von HCl zu dem Medium aufgehoben. Konkret wurde zunächst das Medium auf pH 3,0 eingestellt, dann mit 10 mM Cadaverin supplementiert, wodurch der pH-Wert auf etwa 3,6 stieg, und schließlich mit HCl wieder auf 3,0 eingestellt. Wenn die Zellen nun in diesem Medium dem Säurestress ausgesetzt wurden, zeigte sich, dass die Überlebenswahrscheinlichkeit nicht höher war als bei Zellen, die in LB pH 3-Medium ohne Cadaverin inkubiert worden waren (Abb. 42). Anhand dieser Ergebnisse zeigte sich, dass der Überlebensvorteil, zumindest unter den hier gewählten Versuchsbedingungen, tatsächlich in der Erhöhung des externen pH-Wertes durch Cadaverin lag.



**Abb. 42: Wirkungsweise von Cadaverin bei extremen Säurestress**

Zellen *E. coli* MG1655-*cadC* der logarithmischen Wachstumsphase wurden für 30 min in LB-Medium bei pH 5,8 adaptiert. Anschließend wurden die Zellen in LB-Medium inkubiert, welches zunächst mit 0 oder 10 mM Cadaverin versetzt wurde und anschließend durch Titration mit HCl auf pH 3 eingestellt wurde. Unmittelbar (■) oder 120 min nach Beginn der Inkubation (■) wurde die LZZ durch Ausplattieren auf LB-Agar-Platten ermittelt. Die LZZ unmittelbar nach Beginn der Inkubation wurde als 100% definiert.

### 3.5.3 Induktion des Cad-Systems bei Zellen der stationären Phase

Der Eintritt in die stationäre Phase verleiht *E. coli* eine potente konstitutive Säureresistenz. Von dem Gad-System ist bekannt, dass es in der stationären Phase konstitutiv exprimiert wird und daher zumindest teilweise verantwortlich ist für diese konstitutive Säureresistenz (Ma *et al.*, 2002). Um zu testen, ob auch das Cad-System für diese konstitutive Säureresistenz von Zellen der stationären Phase mitverantwortlich ist und ob die Wachstumsphase einen Einfluss auf die Induktion des Cad-Systems hat, wurde eine simulierte Magenpassage wie in 3.4 beschrieben mit Zellen der stationären Wachstumsphase durchgeführt.

Dazu wurden Zellen des Wildtyps MG1655 bis zur stationären Phase kultiviert, gesammelt, in frischem LB-Medium resuspendiert und dabei eine  $OD_{600} \sim 1$  eingestellt und dann sofort durch Zugabe von HCl und Belüftung mit Mischgas induziert. Die gemessenen Werte für die *cadBA*-Transkription, *cadA*-Expression, Lysin- und Cadaverin-Konzentration wichen dabei nicht signifikant von denen ab, wie sie für die Zellen der logarithmischen Wachstumsphase (siehe 3.4) ermittelt wurden (Daten nicht gezeigt). Die Daten indizierten, dass das Cad-System bei Eintritt in die stationäre Phase nicht konstitutiv exprimiert wird und die Wachstumsphase keine besondere Relevanz für die Induktion des Cad-Systems zu haben scheint.

## 4. Diskussion

### 4.1 Bindung von CadC an den P<sub>Cad</sub>-Promotor

Die *cadBA*-Expression ist von verschiedenen Faktoren, wie dem extrazellulären pH-Wert, der Lysin- und der Cadaverin-Konzentration oder dem O<sub>2</sub>-Partialdruck abhängig. Bisherige genetische Analysen konnten nicht eindeutig klären, ob der Sensor/Regulator CadC all diese unterschiedlichen Reize selbst wahrnimmt, oder ob noch weitere Elemente in die Reizwahrnehmung und die Regulation des *cadBA*-Operons involviert sind. Eine biochemische Charakterisierung von CadC wurde bisher noch nicht vorgenommen. Zu diesem Zweck sollte die genaue Bindestelle von CadC auf dem P<sub>Cad</sub>-Promotor identifiziert und anschließend die Bindung von gereinigtem CadC an die DNA unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden.

#### 4.1.1 Identifizierung der CadC-Bindestellen

Mit Hilfe von DNaseI-Schutzexperimenten wurden die Bindestellen von gereinigtem und rekonstituiertem CadC auf dem *cadBA*-Promotor bestimmt. Die identifizierte Bindestelle Cad1 wurde im Bereich von bp -144 bis bp -112 am stärksten vor dem DNase-Verdau geschützt. Allerdings wurden auch Bereiche weiter stromaufwärts bis bp -155 verstärkt geschützt. Von bp -148 bis -132 erstreckt sich die palindromische Sequenz 5'-TAAACATT-N-AATGTTTA-3'. Da diese möglicherweise für die Erkennung von Cad1 durch CadC wichtig ist, wurde für nachfolgende Experimente der Bereich von bp -150 bis -112 als Bindestelle Cad1 definiert.

Die identifizierte Bindestelle Cad2 wurde am stärksten vor dem DNaseI-Verdau im Bereich von bp -89 bis bp -59 geschützt, allerdings wurde auch die Sequenz stromabwärts bis bp -30 im Vergleich zur Kontrolle verstärkt geschützt. Die Bindung von CadC an die -89/-59 Region würde gut mit den Ergebnissen von Meng und Bennett (1992 b) korrelieren, während eine Bindung bis bp -30 die -35 Erkennungssequenz der RNA-Polymerase verdecken würde, was unwahrscheinlich erscheint. Daher wurde für die weitere Charakterisierung der Bereich von bp -89 bis bp -59 als Bindestelle Cad2 definiert.

Generell sind die Sequenzhomologien zwischen den beiden Bindestellen relativ gering, was darauf hindeutet, dass beide Bindestellen unterschiedliche Funktionen bei der Aktivierung der *cadBA*-Expression haben könnten, worauf später noch eingegangen wird.

#### 4.1.2 Bindung von CadC an die Bindestellen *in vitro*

Die Bindung von gereinigtem CadC an DNA-Fragmente mit der Sequenz von Cad1 und Cad2 wurde mit Gel-Retardationsexperimenten und Filterbinde-Assays untersucht. Beide DNA-

Fragmente konnten von CadC gebunden werden. Die Affinität zu Cad1 war dabei größer als zu Cad2.

Bereits in früheren Experimenten wurde gezeigt, dass CadC auch an unspezifische DNA bindet, und zwar mit Affinitäten, die nur um das 5-10-fache unter denen für die spezifische Bindung an Cad2 liegen. Die Transmembrantopologie von CadC bereitet einige Schwierigkeiten für die Analyse der DNA-Bindung *in vitro* durch Gel-Retardationsexperimente und Filterbinde-Assays, die teilweise für diesen geringen Unterschied zwischen spezifischer und unspezifischer DNA-Bindung verantwortlich sein könnten:

- ◆ In Phospholipiden rekonstituiertes CadC läuft nicht in das Gel ein, sondern verbleibt in den Taschen des Gels, und somit verbleiben natürlich auch Protein-DNA-Komplexe in den Taschen. Dadurch lässt sich nicht bestimmen, wie viele CadC-Moleküle tatsächlich an der DNA binden.
- ◆ Da DNA-Moleküle nicht membrangängig sind, können nur solche Proteine DNA binden, deren DNA-bindende Domäne nach außen ragen. Um also genaue Bindungskonstanten bestimmen zu können, müsste die prozentuale Verteilung der Orientierung der Proteine in den Liposomen bekannt sein. Aufgrund der Verteilung der hydrophilen Domänen in CadC wurde davon ausgegangen, dass bei etwa 50% der CadC-Moleküle die N-terminale Domäne nach außen orientiert war.
- ◆ Die genauen Bedingungen im Inneren der Proteoliposomen lassen sich nicht exakt bestimmen. Durch Zugabe eines Puffers mit einem definiertem pH-Wert, Lysin-Konzentration etc., kann nicht sichergestellt werden, dass dieser Puffer mit seinen Bestandteilen auch in das Innere der Proteoliposomen gelangt, z. B. ist die Lipiddoppelschicht für Protonen relativ impermeabel. Um dieses Problem zu lösen, wurden die Proteoliposomen nach Zugabe des entsprechenden Puffers durch eine 50 nM Membran extrudiert, wodurch die Liposomen sich öffnen und wieder schließen. Durch diese Prozedur sollte erreicht werden, dass intern und extern dieselben Bedingungen herrschen, zudem werden die Proteoliposomen unilammelar. Wie effizient diese Prozedur jedoch tatsächlich ist, lässt sich nicht genau bestimmen.

Daneben wurde auch die Bindung von CadC an Cad1 und Cad2 bei niedrigen und neutralen pH-Werten und in Abhängigkeit von Lysin, dem Ko-Induktor der *cadBA*-Expression *in vivo*, und Cadaverin, einem Inhibitor der *cadBA*-Expression *in vivo*, getestet. Weder durch unterschiedliche pH-Werte noch durch Lysin oder Cadaverin wurde die Bindung von CadC an die DNA-Fragmente signifikant beeinflusst. Der Grund für diesen Befund ist nicht klar. Wie CadC in der Zelle die *cadBA*-Transkription aktivieren soll, wenn sich die Affinität unter induzierenden Bedingungen zur DNA nicht verändert, ist schwer vorstellbar. Möglicherweise sind die oben diskutierten

Schwierigkeiten bei der Analyse der CadC-Bindung an die DNA *in vitro* dafür verantwortlich, dass keine veränderten Bindeaffinitäten beobachtet werden konnten. Eine andere Möglichkeit ist die Existenz von zusätzlichen Faktoren, die *in vivo* die CadC-DNA-Interaktion beeinflussen. So ist das Membranprotein LysP in die Lysin-Abhängigkeit der *cadBA*-Expression involviert und der Regulator H-NS ist wichtig für die Repression der *cadBA*-Expression bei neutralen pH-Werten. Das Fehlen dieser Komponenten bei den DNA-Bindeexperimenten *in vitro* könnte also dafür verantwortlich sein, dass keine unterschiedlichen Bindeaffinitäten unter induzierenden und nicht-induzierenden Bedingungen beobachtet werden konnten.

#### 4.1.3 Einfluss der Bindestellen *in vivo*

Die Relevanz der beiden Bindestellen Cad1 und Cad2 wurde auch *in vivo* untersucht. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Derivate der *cadBA*-Promotorregion vor eine promotorlose Kopie des *lacZ*-Gens kloniert, so dass die Funktionalität des jeweiligen Promotors als  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität gemessen werden konnte. Der Stamm CK1 besaß einen Promotor mit beiden Bindestellen Cad1 und Cad2; dem Stamm CK2 fehlte Cad1 in der Promotorregion und bei dem Stamm CK3 wurde die Cad2-Seite durch eine 30 bp lange zufällige DNA Sequenz ersetzt. Die *in vivo* Tests zeigten eindeutig, dass beide Bindestellen Cad1 und Cad2 für eine regulierte Aktivierung vom  $P_{\text{Cad}}$ -Promotor aus notwendig sind, denn eine signifikante Steigerung der Expression unter induzierenden Bedingungen bei niedrigen pH-Wert und in Gegenwart von Lysin konnte nur in Stamm CK1 beobachtet werden. In Stamm CK2 waren sowohl unter induzierenden als auch unter nicht-induzierenden Bedingungen die Aktivitäten vergleichbar mit denen von CK1 unter nicht induzierenden Bedingungen, in CK3 waren unter allen Bedingungen die Aktivitäten sogar noch um etwa 50% reduziert.

Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Versuche zeigten, dass die *cadBA*-Expression streng abhängig von CadC ist. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine Stimulation der RNA-Polymerase durch CadC. Die stärkere *cadBA*-Expression in Stamm CK2, der nur die Cad2-Seite trägt, im Vergleich zu Stamm CK3, der nur die Cad1-Seite trägt, indiziert, dass diese Stimulation durch CadC-Moleküle erfolgt, die an die Cad2-Seite gebunden sind. Die DNA-Bindeexperimente *in vitro* zeigten, dass eine festere Bindung von CadC an die Bindestelle Cad1 erfolgt. Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse also daraufhin, dass bei der transkriptionellen Aktivierung des *cadBA*-Operons die initiale Bindung von CadC an der Bindestelle Cad1 geschieht. Durch diese Bindung wird anschließend die Bindung von CadC an Cad2 erleichtert und stabilisiert. An Cad2 gebundene CadC-Moleküle könnten anschließend die Transkription selbst initiieren. Dieses Modell könnte auch die verringerte *cadBA*-Expression in den Stämmen CK2 und CK3

erklären. Im Stamm CK2 könnte es zu einer Stimulation der RNA-Polymerase durch CadC kommen, aber das Fehlen der Cad1-Seite ermöglicht nur eine instabile Bindung an die relativ schwache Bindestelle Cad2. Im Stamm CK3 könnte zwar eine feste Bindung an die Cad1-Seite erfolgen, aber nicht eine Interaktion mit der RNA-Polymerase, so dass die geringen gemessenen Aktivitäten wohl auf eine basale Aktivität der RNA-Polymerase zurückzuführen wären

#### 4.2 Repression der *cadBA*-Expression unter nicht-induzierenden Bedingungen

Alle CK-Stämme zeigten unter nicht-induzierenden Bedingungen eine deutlich erhöhte *cadBA*-Expression im Vergleich zum Wildtyp. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die CK-Stämme nur den Bereich bis bp -150 vor Transkriptionsstart des *cadBA*-Promotorbereichs umfassten. Da die intergenische Region zwischen *cadC* und *cadBA* jedoch ca. 350 bp umfasst, wäre es möglich, dass Bereiche stromaufwärts von bp -150 vorhanden sind, die für eine Repression der *cadBA*-Transkription bei neutralen pH-Werten verantwortlich sind.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden unterschiedlich lange *cadBA*-Promotor-Fragmente auf ihre Fähigkeit hin getestet, die *cadBA*-Transkription bei neutralen pH-Werten und unter aeroben Bedingungen zu reprimieren. Durch sukzessive Verlängerung des Promotorbereichs über bp -260 hinaus, relativ zum *cadBA*-Transkriptionsstart, konnte im Wildtypstamm MC4100 eine signifikante Repression der *cadBA*-Expression bei neutralen pH-Werten und unter aeroben Bedingungen beobachtet werden. Im *hns*-Deletionsstamm *E. coli* PD32 hingegen konnte diese Repression nicht beobachtet werden. Die Ergebnisse zeigten, dass die Expression des *cadBA*-Operons unter nicht-induzierenden Bedingungen durch H-NS reprimiert wird.

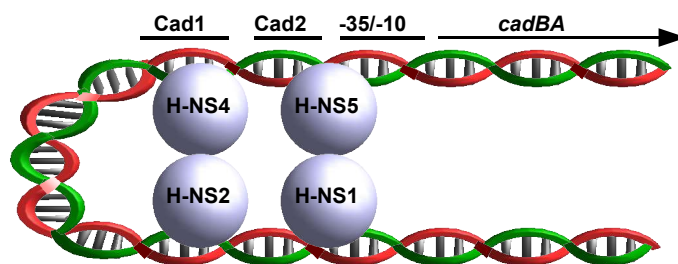
Das H-NS-Protein in *E. coli* hat eine relative Molekülmasse von 15,4 kDa und liegt in einer Kopienzahl von etwa 15000-20000 pro Zelle vor (Dorman, 2004). H-NS ist ein globaler Regulator, der zumeist als Repressor in die Regulation einer Vielzahl von Genen in *E. coli* und anderen Enterobakterien involviert ist. Es gibt auf der DNA keine Konsensus-Sequenz für eine H-NS-Bindung, stattdessen bindet es bevorzugt an AT-reiche und intrinsisch gekrümmte DNA-Bereiche. Durch eine Computer-gestützte Analyse der *cadBA*-Promotoregion konnten 5 potentielle Bindestellen für das H-NS Protein identifiziert werden. Im Rahmen der Experimente konnte gezeigt werden, dass zumindest die zwei potentiellen Bindestellen "H-NS1" und "H-NS2", die stromaufwärts von bp -260 und bp -290 liegen, in die Repression involviert sind. Die "H-NS4"-Seite überlappt mit der Cad1-Bindestelle, die "H-NS5"-Bindestelle überlappt mit der Cad2-Bindestelle und der -35/-10-Region des *cadBA*-Promotors. Aufgrund dieser Lage konnte ihr Einfluss auf die Repression der *cadBA*-Expression nicht getestet werden.

Abhängig von der Position der H-NS-Bindestellen auf der DNA werden verschiedene Mechanismen

für die H-NS vermittelten Repression propagiert. Wenn die H-NS-Bindestellen mit der -35/-10 Promotorregion eines Gens überlappen, verdeckt gebundenes H-NS vermutlich die Bindestelle der RNA-Polymerase und reprimiert dadurch die Transkription. Dies ist z. B. der Fall bei der Repression des *rrnB*-Gens in *E. coli* (Tippner *et al.*, 1994) oder des *virB*-Gens in *Shigella flexneri* (Tobe *et al.*, 1993).

Ein anderer möglicher Mechanismus ist die Bindung von H-NS an DNA-Bereiche stromaufwärts oder stromabwärts von Promotorelementen, z. B. bei der Repression von *proU* aus *Salmonella enterica* (Owen-Hughes *et al.*, 1992) oder *toxT* aus *V. cholerae* (Nye *et al.*, 2000). Durch diese Bindung könnten lokale Superspiralisierungen in der DNA induziert werden. Dadurch könnten Promotorelemente in einer Konformation fixiert werden, die eine Bindung der RNA-Polymerase erschweren (Owen-Hughes *et al.*, 1992). Alternativ könnte auch die Formation von offenen Transkriptionskomplexen erschwert werden, was ebenfalls die Transkription reprimieren würde (Spassky *et al.*, 1984).

Die Existenz mehrerer potentieller H-NS-Bindestellen in der regulatorischen Region des *cadBA*-Operons sowohl innerhalb als auch außerhalb der Promotor-Sequenz, indiziert, dass die Transkription des *cadBA*-Operons durch einen so genannten "Klammermechanismus" reprimiert werden könnte, wie er für den Virulenzgenpromotor *virF* aus *Shigella flexneri* (FalKoni *et al.*, 2001) oder den *gadA*-Promotor aus *E. coli* (Giangrossi *et al.*, 2005) postuliert wird. Dieser Mechanismus beruht auf der Fähigkeit von H-NS, Protein-Protein-Interaktionen auszubilden und dadurch ein „Looping“ der DNA zu induzieren. Konkret würde bei der Repression des *cadBA*-Operons ein H-NS-Molekül, das an die "H-NS1"- Seite bindet, mit einem an "H-NS5" gebundenem Molekül interagieren, und ein H-NS-Molekül, das an "H-NS2" bindet, würde mit einem H-NS-Molekül an "H-NS4" interagieren. Dies würde zu einem "Looping" der DNA und zu einer Überdeckung der schwachen Bindestelle "Cad2" und der -35/-10 Binderegion der RNA-Polymerase führen (Abb. 43). H-NS bildet also einen Repressionskomplex aus.



**Abb. 43: Modell der H-NS vermittelten Repression des *cadBA*-Operons unter nicht-induzierenden Bedingungen**  
Der globale Repressor H-NS bindet an die Bindestellen „H-NS1“, „H-NS2“, „H-NS4“ und „H-NS5“ innerhalb der regulatorischen Region des *cadBA*-Operons. Dies führt zu einem „Looping“ der DNA und resultiert in einer Repression des *cadBA*-Operons unter nicht-induzierenden Bedingungen.

Bei den Deletionsanalysen der *cadBA*-Promotorregion konnte in den Stämmen MC4100/P<sub>Cad</sub>150, MC4100/P<sub>Cad</sub>181, MC4100/P<sub>Cad</sub>221 und MC4100/P<sub>Cad</sub>260 die *cadBA*-Expression nicht reprimiert werden, da die "H-NS1"-Seite und die "H-NS2"-Seite nicht vorhanden waren. Bei neutralen pH-Werten war in diesen Stämmen die *cadBA*-Expression zwar erhöht, aber immer noch deutlich geringer als die *cadBA*-Expression bei niedrigen pH-Werten. Dies deutet darauf hin, dass ein niedriger pH eine Aktivierung von CadC induziert und somit CadC ein pH-Sensor ist.

In den oben genannten Stämmen war die *cadBA*-Expression unter aeroben Bedingungen höher als unter anaeroben Bedingungen. Dies indiziert, dass anaerobe Bedingungen keine Aktivierung von CadC induzieren und CadC daher wahrscheinlich kein O<sub>2</sub>-Sensor ist. Die stärkere *cadBA*-Expression unter anaeroben Bedingungen im Wildtyp ist daher vermutlich nicht auf eine verstärkte Aktivität von CadC unter diesen Bedingungen zurückzuführen, sondern auf andere Mechanismen.

Die Bindung von H-NS ist abhängig von der DNA-Topologie. Da die DNA-Topologie unter anaeroben Bedingungen verändert wird (Dorman *et al.*, 1988; Cartossa und Aon, 1993), könnten möglicherweise Änderungen in der DNA-Topologie der regulatorischen Region des *cadBA*-Operons unter anaeroben Bedingungen die Bindung von H-NS schwächen und dadurch eine verstärkte *cadBA*-Expression erlauben.

Daneben existieren zwei Studien, die einen Einfluss des Zwei-Komponenten-Systems ArcA/ArcB auf die *cadBA*-Expression unter anaeroben Bedingungen nahe legen. Die membrangebundene Sensor kinase ArcB wird unter anaeroben oder mikroaerophilen Bedingungen autophosphoryliert und katalysiert daraufhin die Transphosphorylierung des zytosolischen Antwortregulators ArcA. ArcA-P ist an der Aktivierung oder Repression von mindestens 30 Operons beteiligt, die zumeist in den respiratorischen Metabolismus involviert sind. Reams *et al.* (1997) maßen in *arcA* und *arcB*-Mutanten *cadBA*-Expressionen, die unter anaeroben Bedingungen nur wenig höher waren als unter aeroben Bedingungen.

Liu und Wulf (2004) konnten durch Computer-gestützte Sequenzvergleiche einen Bereich auf der *cadBA*-Promotorregion stromaufwärts der CadC-Bindestellen identifizieren (bp -190 bis -175, relativ zum *cadBA*-Transkriptionsstart), der Ähnlichkeiten mit der Konsensus-Sequenz der ArcA-P Bindestelle aufweist, wenn auch die Sequenzhomologien relativ gering waren. Unter anaeroben Bedingungen könnte also phosphoryliertes ArcA helfen, den H-NS vermittelten Repressorkomplex zu lösen, was die erhöhte *cadBA*-Expression unter anaeroben Bedingungen erklären würde.



### 4.3 Untersuchungen zur Aktivierung von CadC unter induzierenden Bedingungen

Unter induzierenden Bedingungen wird der oben beschriebene Repressionskomplex durch die Bindung von CadC aufgelöst und die *cadBA*-Transkription initiiert. Die Lysin-Abhängigkeit der *cadBA*-Expression wird vermutlich durch LysP vermittelt (Neely *et al.*, 1994), und für die verstärkte Expression unter anaeroben Bedingungen ist, wie diskutiert, vor allem eine schwächere Repression durch H-NS verantwortlich. Die deutlich stärkere *cadBA*-Expression bei niedrigen pH-Werten, selbst in Abwesenheit des Repressors H-NS, indiziert, dass der extrazelluläre pH-Wert eine Aktivierung von CadC bewirkt, und dieses aktive CadC die *cadBA*-Transkription stärker induziert als inaktives CadC. Wie der extrazelluläre pH-Wert eine Aktivierung von CadC induziert, ist bislang nicht geklärt.

#### 4.3.1 Oligomerisierung von CadC

Für zahlreiche prokaryontische und eukaryontische Transkriptionsregulatoren konnte eine Interaktion als Oligomer mit der DNA nachgewiesen werden. So binden OmpR oder PhoB als Dimere an die Erkennungssequenz (Okamura *et al.*, 2000), der Repressor LacI (Chen und Matthews, 1992) oder die Aktivatoren der LysR-Familie (Schell, 1993) als Tetramere.

Die Struktur der *cadBA*-Promotorregion mit zwei CadC-Bindestellen legt die Vermutung nahe, dass auch CadC als Oligomer an  $P_{Cad}$  binden könnte. Zur Überprüfung dieser Theorie wurden zunächst *in vitro* Quervernetzungsstudien mit His<sub>10</sub>-CadC, sowohl in Membranvesikeln als auch in gereinigter und rekonstituierter Form, durchgeführt. In beiden Fällen konnte neben einer prominenten Monomerbande auch eine Bande bei etwa 250 kDa detektiert werden, was auf eine Tetramerisierung von CadC schließen ließ.

Dieselben Versuche wurden auch mit dem gereinigten und rekonstituierten, C-terminal verkürzten Derivat CadC 1-215 durchgeführt. Dabei konnte neben der Monomerbande nur eine stark ausgeprägte Abbaubande detektiert werden, aber keine Bande, die auf eine Oligomerisierung dieses Derivats schließen ließe. Daraus folgt, dass die C-terminale Signaleingangsdomäne auch für die Oligomerisierung von CadC notwendig ist.

Um die Funktionalität von CadC 1-215 *in vivo* zu testen, wurde geprüft, ob das C-terminal verkürzte Derivat die *cadBA*-Expression in einem *E. coli*-Stamm mit einer chromosomalen *cadC*-Deletion komplementieren konnte. Ein Plasmid-kodiertes CadC-Derivat konnte, auch bei geringer Kopienzahl, unter induzierenden Bedingungen die *cadBA*-Transkription initiieren. Das Plasmid-kodierte Derivat CadC 1-215 hingegen war in geringer Kopienzahl nicht in der Lage ist, die *cadBA*-Transkription unter induzierenden Bedingungen zu aktivieren. Möglicherweise konnte CadC 1-215 die *cadBA*-Expression nicht mehr aktivieren, weil dieses Derivat keine Tetramere mehr ausbildete.

Dieser Befund unterstützt die Vermutung, dass aktives CadC unter induzierenden Bedingungen als Tetramer an die DNA bindet.

Daneben wurde die Oligomerisierung von CadC auch *in vivo* mit Hilfe von  $\lambda$ CI-CadC Hybridproteinen getestet. Als Maß für die Oligomerisierung diente dabei der Grad der Repression eines *lacZ*-Gens, das unter Kontrolle von Derivaten des  $\lambda$ CI-Operators stand. Durch Messungen mit dem Stamm *E. coli* JH372 konnte nachgewiesen werden, dass CadC generell zur Oligomerisierung *in vivo* fähig ist. Experimente mit dem Stamm *E. coli* JH 607 zeigten darüber hinaus, dass es sich bei diesen Oligomeren vermutlich um Tetramere (oder kooperativ bindende Dimere) handelte, was mit den Ergebnissen der Quervernetzungsstudien korrelierte.

Die Beobachtung, dass CadC vermutlich als Oligomer an  $P_{Cad}$  bindet, führte zu einem Modell für die Aktivierung von CadC durch Oligomerisierung. Nach diesem Oligomerisierungsmodell wäre CadC in seiner inaktiven Form ein Monomer mit geringer Affinität zu  $P_{Cad}$ , und würde in seiner aktiven Form Oligomere mit einer hohen Affinität zu  $P_{Cad}$  ausbilden. Der Wechsel zwischen dem inaktiven Monomer und dem aktiven Oligomer würde dabei durch die Umgebungsbedingungen moduliert, unter nicht-induzierenden Bedingungen würde CadC als Monomer vorliegen, und induzierende Bedingungen würden durch konformationelle Änderungen in der C-terminalen Domäne die Oligomerisierung von CadC auslösen.

Für verschiedene membrangebundene Sensoren wurde der oligomere Zustand untersucht. In eukaryontischen Zellen liegen die Typ1-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen im inaktiven Zustand als Monomer vor. Die Dimerisierung dieser Rezeptoren erfolgt nach Bindung eines extrazellulären Liganden und ist ein entscheidender Mechanismus bei der Signaltransduktion (Cunningham *et al.*, 1991; Hurrwitz *et al.*, 1991). Der Aspartat-Rezeptor Tar aus *E. coli* hingegen liegt unabhängig von der Ligandenbindung als Dimer vor, so dass die Oligomerisierung hier keine Rolle bei der Signaltransduktion spielt (Milligan und Koshland, 1988). Der Transkriptionsregulator TraR aus *A. tumefaciens* liegt in inaktiver Form als Monomer vor (Qin *et al.*, 2000). Die Bindung des Autoinducers Acyl-Homoserinlacton induziert eine Dimerisierung von TraR und anschließend die Bindung an die DNA.

Um zu testen, ob die Umgebungsbedingungen einen Einfluss auf die Oligomerisierung von CadC haben, wurden die Quervernetzungsexperimente bei unterschiedlichen pH-Werten und in Anwesenheit des Ko-Induktors Lysin oder des Repressors Cadaverin durchgeführt. Die Tetramerbande war jedoch in allen Fällen in etwa gleich stark ausgeprägt, was darauf hinweist, dass die Oligomerisierung von CadC nicht durch die Umgebungsbedingungen moduliert wird. Auch bei den *in vivo* Experimenten konnte keine deutlich veränderte Oligomerisierung von CadC in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen beobachtet werden. Unter induzierenden

Bedingungen (pH 5,8) war die *lacZ*-Expression zwar ein wenig stärker reprimiert als unter nicht-induzierenden (pH 7,6) Bedingungen, was eine stärkere Oligomerisierung anzeigt. Die Unterschiede waren aber zu gering, als das man daraus ableiten könnte, dass CadC bei neutralem pH-Wert als Monomer und bei niedrigem pH-Wert als Tetramer vorliegt und dies der entscheidende Aktivierungsmechanismus sei.

Zusammengenommen indizieren die Ergebnisse der *in vitro*- und *in vivo*-Experimente, dass CadC im aktiven Zustand als Tetramer an die DNA bindet. Die Experimente lieferten allerdings keinen Anhaltspunkt dafür, dass die Oligomerisierung von CadC durch die Umgebungsbedingungen moduliert wird. Daher spielt die Oligomerisierung wahrscheinlich keine entscheidende Rolle bei der Aktivierung und der Signaltransduktion. CadC scheint auch unter nicht-induzierenden Bedingungen als Tetramer vorzuliegen, so dass ein Wechsel zwischen inaktivem und aktivem Zustand vermutlich durch einen anderen Mechanismus realisiert wird.

Auch für ToxR wurden Untersuchungen über den Oligomerisierungszustand und dessen Modulation durchgeführt. Die Ergebnisse deuteten daraufhin, dass ToxR Dimere ausbildet, allerdings konnte auch hier kein eindeutiger Zusammenhang zwischen induzierenden Bedingungen und dem Oligomerisierungsgrad des Proteins nachgewiesen werden.

#### 4.3.2 Untersuchungen zur proteolytischen Prozessierung von CadC

Die oben diskutierten Experimente indizierten, dass eine Transition vom inaktiven Monomer unter nicht-induzierenden Bedingungen zum aktiven Oligomer unter induzierenden Bedingungen vermutlich nicht den Aktivierungsmechanismus für CadC darstellt. Aufgrund der ähnlichen Transmembrantopologie von CadC und Proteinen wie RseA aus *E. coli*, und Notch oder ATF6 aus eukaryontischen Zellen, die im Zuge der Signaltransduktion proteolytisch gespalten werden, wurde eine Arbeitshypothese für die Aktivierung von CadC durch eine Regulierte Proteolyse (RP) aufgestellt. Ein RP-Mechanismus wäre eine elegante Erklärung für die ungewöhnliche Transmembrantopologie der ToxR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren. Unter nicht-induzierenden Bedingungen würde durch die Membranlokalisierung die DNA-bindende Domäne von CadC vom  $P_{\text{Cad}}$ -Promotor distanziert. Induzierende Bedingungen (niedriger pH, Lysin) würden eine proteolytische Spaltung in der C-terminalen periplasmatischen Domäne von CadC auslösen, die wiederum in einer Exposition einer proteolytischen Spaltstelle in der Transmembrandomäne oder der zytoplasmatischen Domäne und der nachfolgenden Abspaltung und Loslösung der zytoplasmatischen, N-terminalen Domäne vom membranständigen Teil des Proteins resultieren würden. Dadurch könnte die DNA-bindende Domäne den  $P_{\text{Cad}}$ -Promotor durch freie Diffusion erreichen.

Die Regulierte Proteolyse (RP) ist in den letzten Jahren als ein wichtiger Mechanismus der zellulären Signaltransduktion sowohl bei pro- als auch bei eukaryontischen Zellen identifiziert worden. Beispiele hierfür sind ATF6 (Haze *et al.*, 1999), Ire1 (Niwa *et al.*, 1999), Notch (De Stropper *et al.*, 1999), die Aktivierung von SREBP (Brown und Goldstein, 1997) oder die Freisetzung des alternativen  $\sigma$ -Faktors  $\sigma^E$  in *E. coli* (Ades *et al.*, 1999). Bei diesem Prozess werden membranintegrale Proteine proteolytisch gespalten, was zur Freisetzung eines Signalpeptids oder Regulationsfaktors führt.

Daneben wurden in Bakterien mehrere Systeme beschrieben, bei denen die inaktiven Formen regulatorischer Elemente an die Zytoplasmamembran assoziiert sind, z. B. TraR aus *Agrobacterium tumefaciens* (Qin *et al.* 2000), MalT aus *E. coli* (Böhm und Boos, 2004), PutA aus *S. typhimurium* (Ostrovsky de und Maloy, 1993), LuxR aus *V. fischeri* (Kolibachuk und Greenberg, 1993) oder Mlc aus *E. coli* (Plumbridge, 2002).

Für das Quorum-Sensing-Protein TraR aus *A. tumefaciens* konnte gezeigt werden, dass es in Abwesenheit des Autoinducers membranassoziiert vorliegt (Qin *et al.*, 2000). Bei Bindung des Autoinducers Acyl-Homoserinlacton kommt es zunächst zur Loslösung von der Membran, anschließender Oligomerisierung und schließlich zur DNA-Bindung. TraR liegt in der membrangebundenen Form als inaktives Monomer vor, während es nach Ablösung von der Membran zur aktiven Form dimerisiert. In die Dimerisierung sind Bereiche des Proteins involviert, die in der inaktiven Form membranintegriert sind.

MalT, der Aktivator des mal-Operons in *E. coli*, ist durch Interaktion mit der Untereinheit MalK des Maltose-Transporters an die Membran gebunden (Boos und Böhm, 2001). Während des Maltose-Transports löst sich MalT von MalK ab und aktiviert durch DNA-Bindung die Transkription der mal-Gene.

Untermauert wurde das Modell einer RP-Aktivierung von CadC durch zwei Befunde: Lösliche Transkriptionsregulatoren können durch freie Diffusion sehr schnell eine bestimmte Promotorregion in der Zelle erreichen. Aufgrund der Membranintegration ist CadC nicht in der Lage, die cadBA-Promotorregion durch freie Diffusion zu finden. Wie CadC trotzdem an  $P_{Cad}$  binden kann, ist unbekannt. Neely und Olson (1996) schlugen vor, dass es eine räumliche Nähe von CadC und  $P_{Cad}$  geben könnte. Diese unmittelbare Nähe könnte trotz der Membranintegration von CadC eine Bindung an  $P_{Cad}$  ermöglichen. Allerdings konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass CadC auch an  $P_{Cad}$  binden kann, wenn  $P_{Cad}$  auf einem Plasmid oder innerhalb der att-Seite des *E. coli* Chromosoms lokalisiert ist (z. B. im Stamm CK1), und damit nicht in unmittelbarer Nähe von CadC. Die cadBA-Promotorregion scheint also, unabhängig von der Lokalisation in der Zelle, für CadC unbegrenzt zugänglich zu sein. Dieser Befund ist nur schwer zu erklären für ein

membranintegriertes CadC.

Zusätzlich wurde das Proteolysemodell durch die Beobachtung unterstützt, dass während der Reinigung von His<sub>10</sub>-CadC über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie ein Peptid von ca. 20-25 kDa mit His<sub>10</sub>-CadC Ko-eluierte (Küper, 2001). Zudem konnte durch Immunoblots mit dem Penta-His-Antikörper ein His-Tag innerhalb dieses Peptids nachgewiesen werden. Da der His-Tag in His<sub>10</sub>-CadC am N-Terminus lokalisiert ist, könnte es sich bei dem Peptid um die abgespaltene N-terminale Domäne von His<sub>10</sub>-CadC handeln.

Zur Verifizierung des Proteolysemodells wurden unterschiedliche experimentelle Ansätze gewählt. Zunächst konnte das Peptid, das während der Reinigung auftauchte und eine geschätzte Masse von 20-25 kDa hatte, durch massenspektrometrische Analyse als Abspaltungsprodukt von CadC identifiziert werden. Die exakte Länge, bzw. die relative Molekülmasse der abgespaltenen N-terminalen Domäne konnte durch die massenspektrometrischen Analysen allerdings nicht bestimmt werden.

Neben der massenspektrometrischen Analyse wurde auch das Auftreten und die Lokalisation des verkürzten Peptids immunologisch untersucht. Nach dem Modell des RP-vermittelten Aktivierungsmechanismus sollte dieses nur bei Kultivierung der Zellen bei niedrigem pH und nur im Zytoplasma auftreten. Bei Überexpression von *cadC* konnte das Peptid zwar verstärkt detektiert werden, wenn die Zellen bei pH 5,8 kultiviert worden waren, allerdings konnte es nur in der Membranfraktion der Zellen lokalisiert werden und nicht frei im Zytoplasma vorliegend. Um Artefakte durch die Überexpression von *cadC* auszuschließen, wurde auch die Lokalisation von chromosomal kodiertem His<sub>10</sub>-CadC analysiert. Hier trat das verkürzte Peptid bei Zellen, die bei pH 7,6 kultiviert worden waren, in gleichem Maße auf wie bei Zellen, die bei pH 5,8 kultiviert worden waren. Auch hier war es ausschließlich in der Membranfraktion der Zellen lokalisiert, im Zytoplasma konnten keine Spuren der N-terminalen Domäne von CadC detektiert werden.

Da durch Immunoblots die abgespaltene N-terminale Domäne im Zytoplasma nicht detektiert werden konnte, wurde untersucht, ob durch Gel-Retardationsexperimenten mit zytoplasmatischen Extrakten eine sensitivere Detektion der N-terminalen Domäne möglich wäre. Auch mit diesem experimentellen Ansatz konnte eine funktionelle DNA-bindende Domäne von CadC ausschließlich in der Membranfraktion beobachtet werden und nicht im Zytoplasma.

Experimente zur Induktion des Cad-Systems *in vivo* zeigten, dass CadC auch unter induzierenden Bedingungen nur für wenige Minuten in einem aktiven Zustand vorliegt. Für das Modell einer RP-vermittelten Aktivierung ergäbe sich daraus die Konsequenz, dass das abgespaltene Fragment nur für kurze Zeit stabil im Zytoplasma vorläge und schnell wieder abgebaut würde, möglicherweise durch proteolytische Spaltung. Unter diesen Umständen kann es nicht ausgeschlossen werden, dass

dieses nur kurzzeitig vorliegende Peptid zu instabil ist, um es durch Immunoblots oder Gel-Retardations-Experimente nachzuweisen. Daher wurden verschiedene C-terminal verkürzte CadC-Derivate konstruiert, ihre Lokalisation überprüft und auf ihre Fähigkeit hin geprüft, die *cadBA*-Expression zu aktivieren. Das Derivat CadC 1-159 umfasst die gesamte N-terminale Domäne und war fast ausschließlich löslich im Zytoplasma lokalisiert. Nach den Vorhersagen des Proteolysemodells sollte es daher die *cadBA*-Transkription konstitutiv aktivieren können, unabhängig von induzierenden Bedingungen. Tatsächlich jedoch war dieses Derivat weder unter induzierenden noch unter nicht-induzierenden Bedingungen in der Lage, das *cadBA*-Operon zu aktivieren. Immunoblots zeigten, dass das Derivat stabil in der zytoplasmatischen Fraktion vorlag. Die Unfähigkeit die *cadBA*-Expression zu induzieren war also nicht im Abbau von CadC 1-159 begründet.

Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse scheint ein RP-vermittelter Aktivierungsmechanismus für CadC unwahrscheinlich. Die massenspektrometrischen Analysen des Abspaltungsprodukts zeigten nicht ein einzelnes spezifisches Peptid, sondern unterschiedlich große Peptide, was eher auf einen relativ unspezifischen Abbau von CadC hinweist als auf eine gezielte proteolytische Spaltung zur Freisetzung eines Effektormoleküls. Die N-terminale Domäne von CadC konnte nie löslich im Zytoplasma der Zelle detektiert werden, sondern immer nur in der Membranfraktion. Zudem war ein lösliches CadC-Derivat nicht in der Lage, die *cadBA*-Expression zu induzieren. Es konnte also kein deutlicher Hinweis für einen RP-vermittelten Aktivierungsmechanismus gefunden werden.

Eine wichtiger Punkt ist die Frage, ob generell eine DNA-Bindung von der bakteriellen Zytoplasmamembran aus stattfinden kann. Görke *et al.* (2005) untersuchten, ob eine Membranassoziation allein für eine Inaktivierung von Regulatoren hinreichend ist. Dafür wurde ein Derivat des löslichen Repressors LacI aus *E. coli* in der Zytoplasmamembran verankert. Dabei zeigte sich, dass LacI nach wie vor an den *lac*-Operator binden konnte. Die Bindung war unabhängig davon, ob der Operator auf einem Plasmid oder auf dem Chromosom lokalisiert war. Die Autoren folgerten daraus, dass der membrangebundene Repressor nach wie vor ungehinderten Zugang zur DNA hatte und dass die Lokalisation eines Regulators in oder an der bakteriellen Zytoplasmamembran allein nicht notwendigerweise die DNA-Bindung verhindert.

Um die Rolle der Membranlokalisation von CadC und der periplasmatischen Domäne des Proteins genauer zu analysieren, wurde eine Reihe C-terminal verkürzter Derivate konstruiert und deren Lokalisation und Funktionalität überprüft. Dabei waren lösliche CadC-Derivate, unabhängig von der Kopienzahl, nicht in der Lage, die *cadBA*-Expression zu induzieren. Ähnlich wie die löslichen CadC-Derivate waren auch membranassoziierte oder-integrierte CadC-Derivate, denen die periplasmatische Domäne fehlte, bei geringer Kopienzahl nicht in der Lage, die *cadBA*-

Transkription zu aktivieren. Bei einer hohen Kopienzahl hingegen aktivierten alle membranlokalisierten verkürzten CadC-Derivate, und ebenso nicht-verkürztes CadC, die *cadBA*-Transkription konstitutiv, also unabhängig von induzierenden Bedingungen. Da die periplasmatische Domäne essentiell für die Oligomerisierung von CadC ist, konnten die C-terminal verkürzten CadC-Derivate nur Monomere ausbilden und hatten als solche vermutlich eine geringe Affinität zu  $P_{Cad}$ . Daher waren diese Derivate nicht in der Lage, bei geringer Kopienzahl an die DNA zu binden und die *cadBA*-Expression zu aktivieren. Bei hoher Kopienzahl waren auch die Monomere trotz der geringen Affinität in der Lage, an die *cadBA*-Promotorregion zu binden und die Transkription zu initiieren.

Des Weiteren indizierten die Ergebnisse, dass eine Membranständigkeit von CadC für die Aktivierung der *cadBA*-Transkription notwendig ist. Auch verkürzte membranassoziierte Derivate, die aufgrund der Deletion der periplasmatischen Domäne nicht mehr die oligomere Form von CadC ausbildeten, konnten bei Überproduktion das *cadBA*-Operon aktivieren, lösliche Derivate konnten dies auch bei Überproduktion nicht mehr. Also scheint die Membranlokalisierung von CadC nicht nur der Aufnahme extrazellulärer Reize durch die periplasmatische Domäne zu dienen, sondern auch für die Bindung an den  $P_{Cad}$ -Promotor notwendig sein. Der Grund dafür ist unklar. Vielleicht ermöglicht die Membranassoziation lokal erhöhte Proteinkonzentrationen, die die Bindung an die Promotorregion erleichtern.

Daneben zeigten die Experimente, dass für eine Aktivierung der *cadBA*-Expression selektiv nur unter induzierenden Bedingungen eine geringe Kopienzahl von CadC notwendig ist. Eine hohe Kopienzahl führte zu einer konstitutiven *cadBA*-Expression. Die Kopienzahl von CadC in der Zelle wird dabei möglicherweise nicht nur auf transkriptioneller und translationaler Ebene kontrolliert, sondern zusätzlich durch Proteolyse von CadC negativ reguliert. Für chromosomal kodiertes CadC konnte ein signifikanter proteolytischer Abbau sowohl bei neutralen als auch bei niedrigen pH-Werten beobachtet werden. Die Lokalisation des Abspaltungsprodukt in der Membranfraktion ließ es, wie diskutiert, unwahrscheinlich erscheinen, dass dieses Peptid die *cadBA*-Transkription aktiviert. Da *cadC* konstitutiv exprimiert wird, würde sich im Laufe der Zeit eine relativ hohe Kopienzahl einstellen, wenn CadC sehr stabil in der Zelle vorläge. Es ist also vorstellbar, dass ein aktiver proteolytischer Abbau von CadC für eine konstant niedrige Kopienzahl und damit für eine selektive *cadBA*-Expression nur unter induzierenden Bedingungen sorgt.

#### 4.4 Modellierung des Cad-Systems

Um das komplexe Verhalten regulatorischer Netzwerke in der Bakterienzelle besser zu verstehen, hat sich in den letzten Jahren die mathematische Modellierung von Signaltransduktionssystemen zu einem nützlichen Instrument entwickelt. Um einen tieferen Einblick in die Regulation des Cad-Systems und die zelluläre Reaktion auf pH-Stress zu erhalten, wurde ein *in silico*-Modell der Regulation des Cad-Systems aufgestellt. Die Induktion und Aktivität des Cad-Systems *in vivo* wurde während einer simulierten Magenpassage gemessen und anhand der Daten das *in silico*-Modell überprüft. Soweit bekannt ist dies das erste Mal, dass in *E. coli* ein System der extremen Säureresistenz modelliert wurde.

Aus mehreren Gründen ist das Cad-System besonders geeignet für eine Modellierung:

- ◆ Bei dem Regulator CadC handelt es sich um ein sehr einfaches Signaltransduktionssystem, bei dem die extrazelluläre Reizaufnahme, die Reizweiterleitung und die Reaktion in Form der transkriptionellen Aktivierung des *cadBA*-Operons in einem einzigen Protein integriert sind.
- ◆ Verschiedene Komponenten der zellulären Antwort (*cadBA*-Transkription, Synthese von CadA, extrazelluläre Lysin- und Cadaverin-Konzentration, pH-Wert des Mediums) können relativ einfach experimentell gemessen werden.
- ◆ Es existieren bereits Daten über die Aktivitäten von CadA (Sabo *et al.*, 1974) und CadB (Soksawatmaekhin *et al.*, 2004).

Das Modell berücksichtigt, dass die *cadBA*-Expression nur bei niedrigen pH-Werten und in Anwesenheit von Lysin induziert und durch externes Cadaverin reprimiert wird. Die Inhibition in Abwesenheit von Lysin wird durch die Lysin-Permease LysP vermittelt. In Abwesenheit von Lysin wird CadC durch eine Interaktion mit LysP inhibiert. In Gegenwart von Lysin transportiert LysP das Lysin, wodurch die Interaktion mit CadC unterbrochen wird. Das freie CadC liegt bei neutralen pH-Werten in einer inaktiven und bei niedrigen pH-Werten in einer aktiven Form vor. Nur freies aktives CadC kann die *cadBA*-Transkription aktivieren. Durch Cadaverin wird aktives CadC inaktiviert, unabhängig vom pH-Wert.

Grundsätzlich geht das Modell also von der Existenz verschiedener CadC-Populationen in der Zelle aus: (i) aktives CadC [CadC\*] liegt bei niedrigen pH-Werten und in Gegenwart von Lysin vor (ii) inaktives CadC [CadC] liegt bei neutralen pH-Werten und in Gegenwart von Lysin vor (iii) aktives LysP-CadC [LysP-CadC\*] liegt bei niedrigen pH-Werten und in Abwesenheit von Lysin vor (iv) inaktives LysP-CadC [LysP-CadC] liegt bei neutralen pH-Werten und in Abwesenheit von Lysin vor.

Weitere Parameter, die in dem Modell berücksichtigt wurden, sind die Transkriptions- und Translationsraten von *cadA* und *cadB*, die enzymatischen Aktivitäten von CadA und CadB und die



Degradationsraten der *cadBA*-mRNA und von CadA und CadB (Abb. 44).

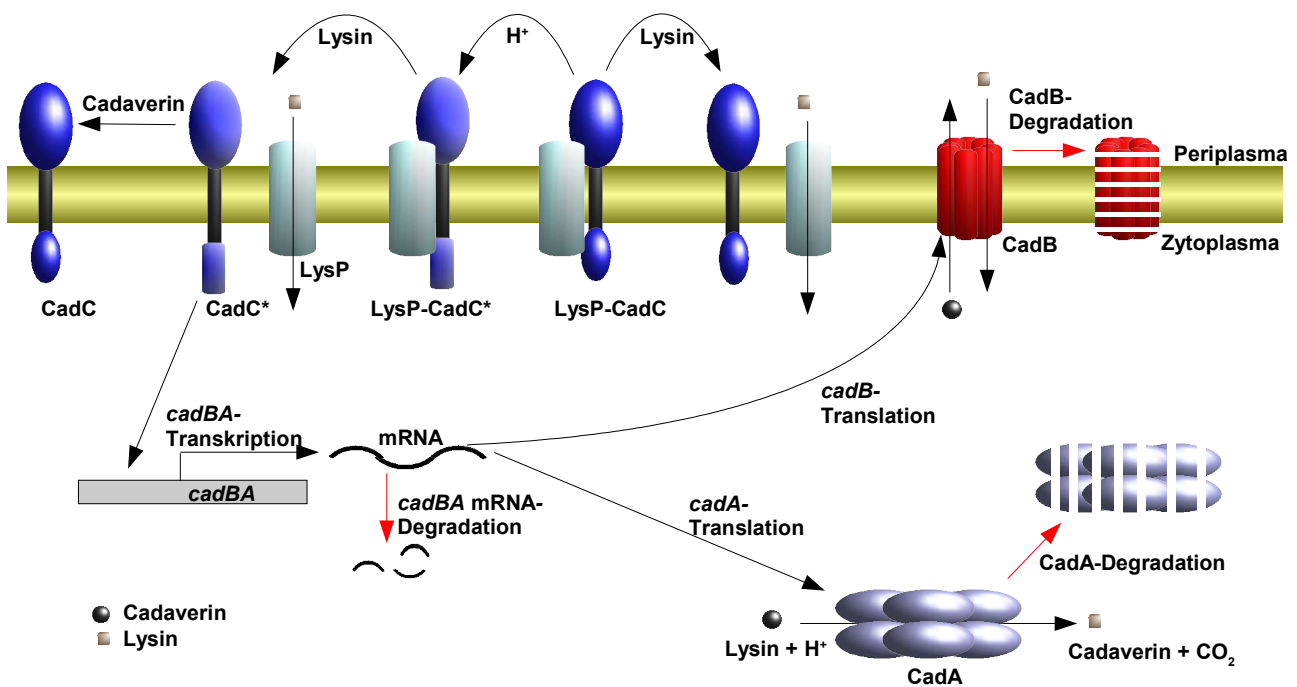


Abb. 44: Schematische Darstellung der durch das *in silico*-Modell beschriebenen Induktion und Aktivität des Cad-Systems

Die Details zu der Abbildung sind im Text erklärt.

Bei einer simulierten Magenpassage *in silico* wird durch einen niedrigen pH-Wert und in Gegenwart von Lysin die *cadBA*-Transkription durch aktives CadC [CadC\*] induziert und es kommt zur Synthese von CadA und CadB. Durch die Aktivitäten von CadA und CadB wird Lysin in die Zelle transportiert, zu Cadaverin umgesetzt und das entstandene Cadaverin wieder ausgeschleust. Dadurch steigt die Konzentration an extrazellulären Cadaverin, welches schließlich den Wechsel von aktiven CadC [CadC\*] zu inaktiven CadC [CadC] und die Beendigung der *cadBA*-Transkription induziert. Die Ausschleusung von Cadaverin bewirkt zudem ein Ansteigen des externen pH-Wertes.

Das Modell beschrieb einen schnellen Anstieg der *cadBA*-Transkription. Aufgrund der Inaktivierung von CadC durch zunehmende Konzentrationen an externen Cadaverin und der hohen Degradationsrate der *cadBA*-mRNA sank die Konzentration an *cadBA*-Transkript nach dem Anstieg schnell wieder ab und pendelte sich auf einem niedrigen Basalniveau ein.

Die Kopienzahl von CadA stieg zunächst an. Nach Abbau der *cadBA*-mRNA blieb die Menge an CadA stabil, da nur von einer geringen Degradation des Proteins ausgegangen wurde.

Die externe Cadaverin-Konzentration stieg zunächst relativ schnell und im weiteren zeitlichen Verlauf etwas langsamer an, während die externe Lysin-Konzentration kontinuierlich abnahm.

Mit der steigenden Cadaverin-Konzentration im Medium stieg auch der pH-Wert des Mediums an. Die Ergebnisse einer simulierten Magenpassage *in vivo* stimmten gut überein mit den modellierten Daten. Unmittelbar nach Beginn der Induktion konnte ein steiler Anstieg der *cadBA*-Transkriptionsrate beobachtet werden. Nach ca. 15 Minuten wurden die maximalen Mengen an Transkript gemessen. Danach sank die Transkriptionsrate wieder auf einen minimalen Basallevel. Es muss deutlich herausgestellt werden, dass zu diesem Zeitpunkt nach wie vor induzierende Bedingungen herrschten, also ein niedriger pH-Wert und ausreichende Konzentrationen von extrazellulärem Lysin. Dies indiziert, dass die *cadBA*-Expression unter induzierenden Bedingungen durch eine negative Rückkopplung reguliert wurde.

Die Menge an CadA in der Zelle stieg kurz nach Beginn der Induktion an. Nach ca. 40 Minuten war nahezu die gesamte *cadBA*-mRNA degradiert worden, daher kam es auch zu keiner weiteren Translation von *cadA*, so dass die Menge an CadA ab diesem Zeitpunkt nicht weiter anstieg. Im weiteren Verlauf des Versuchs blieb die CadA-Kopienzahl relativ stabil, ein signifikanter Abbau konnte nicht beobachtet werden.

Die Lysin-Konzentration im Medium sank während des Versuchs aufgrund der Aktivitäten von CadA und CadB kontinuierlich ab. Die externe Cadaverin-Konzentration stieg kurz nach Beginn der Induktion an, erreichte nach ca. 70 Minuten ein Maximum und blieb im weiteren Verlauf des Versuchs stabil. Der pH-Wert des Mediums stieg parallel zur Cadaverin-Konzentration an.

Der beobachtete Rückgang der *cadBA*-Transkriptionsrate unter induzierenden Bedingungen weist auf eine negative Rückkopplung durch die Aktivität von CadA und CadB hin. Diese negative Rückkopplung könnte durch die Inaktivierung des Transkriptionsaktivators CadC durch Cadaverin realisiert werden. Daten aus der Literatur geben deutliche Hinweise darauf, dass steigende Konzentrationen periplasmatischen/extrazellulären Cadaverins die *cadBA*-Expression inhibieren. Olson und Mitarbeiter konnten zeigen, dass durch Zugabe von Cadaverin sowohl die Expression als auch die Transkription unterdrückt wird (Neely *et al.*, 1994; Neely und Olson, 1996). In Zellen, in denen das *cadA*-Gen deletiert war, und die so kein Cadaverin mehr produzieren und exkretieren konnten, blieben die hohen Transkriptionsraten über mehr als 60 Minuten stabil (Neely *et al.*, 1996). Maurer *et al.* (2005) berichteten allerdings kürzlich, dass die Expression von *lysP* in Komplexmedium bei niedrigen pH-Werten drastisch erhöht wird. Da eine hohe Kopienzahl von *LysP* zu einer konstitutiven Inhibition der *cadBA*-Expression führt (Neely *et al.*, 1994), wäre es denkbar, dass der Rückgang der *cadBA*-Transkriptionsrate auch auf hohe *LysP*-Konzentrationen in der Zelle und einer daraus resultierenden Inhibition von CadC zurückzuführen ist.

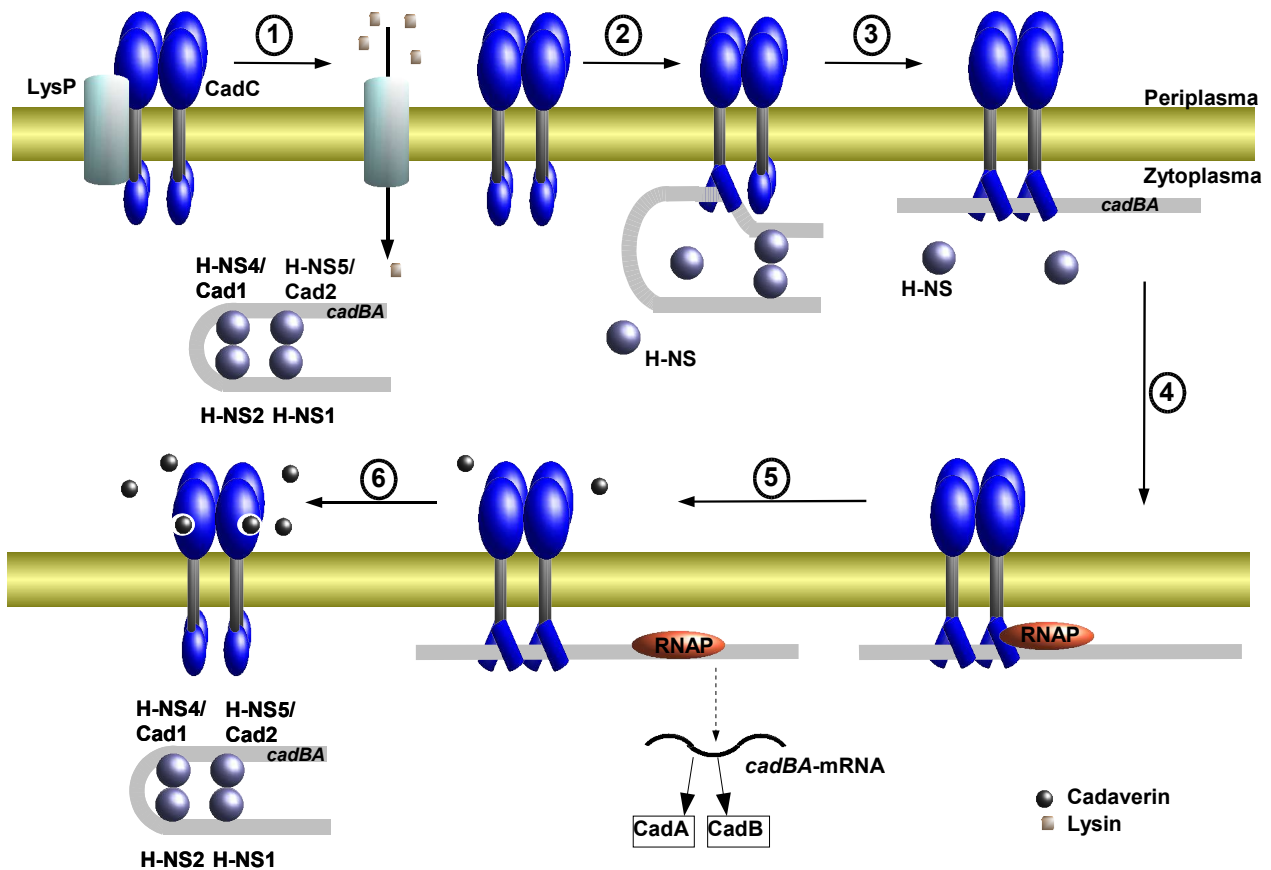
Um die Funktionen von *LysP* und Cadaverin bei der Inaktivierung von CadC unter induzierenden

Bedingungen noch einmal zu evaluieren, wurde eine simulierte Magenpassage *in vivo* durchgeführt, bei der die Zellen 20 Minuten nach Beginn der Induktion geerntet und in neuem Medium (pH 5,5) resuspendiert wurden, wodurch externes Cadaverin entfernt wurde. Der Befund, dass unter diesen Bedingungen die *cadBA*-Transkription erneut kurzzeitig aktiviert wurde, indizierte, dass tatsächlich externes Cadaverin für die Inaktivierung von CadC unter induzierenden Bedingungen verantwortlich war. Die Abwesenheit von externem Cadaverin direkt nach der Resuspendierung in neuem Medium ermöglichte die erneute Aktivierung der *cadBA*-Transkription. Die schnelle Neusynthese und Exkretion von Cadaverin durch CadA und CadB bewirkte dann die erneute Inaktivierung von CadC. Bei einer Inaktivierung von CadC durch LysP wäre nach der Resuspendierung keine erneute *cadBA*-Transkription zu erwarten gewesen.

Neuste biochemische Untersuchungen von CadC indizieren zudem, dass es eine direkte Interaktion von CadC und Cadaverin geben könnte, was ebenfalls auf eine Inaktivierung von CadC durch Cadaverin hindeutet (Christiane Koller, persönliche Mitteilung).

#### 4.5 Modell der transkriptionellen Aktivierung des *cadBA*-Operons durch CadC

Die bisher diskutierten Ergebnisse lassen sich zu einem Modell für die transkriptionelle Aktivierung des *cadBA*-Operons durch CadC integrieren (Abb. 45):



**Abb. 45: Modell der transkriptionellen Aktivierung des *cadBA*-Operons**

Bei neutralen pH-Werten und in Abwesenheit von Lysin wird CadC durch LysP inhibiert und das *cadBA*-Operon durch H-NS reprimiert. In Gegenwart von Lysin wird die Inhibition durch LysP aufgehoben (1). Bei Aktivierung durch einen niedrigen pH bindet CadC zunächst an Cad1 (2) und anschließend an Cad2, wodurch der Repressionskomplex aufgelöst wird (3) und die RNA-Polymerase an den Promotor binden kann (4). CadC aktiviert die Transkription, möglicherweise durch direkte Stimulation der RNA-Polymerase (5). Durch steigende Cadaverin-Konzentrationen kommt es zur Inaktivierung von CadC und dadurch zum Abbruch der Transkription (6).

Bei neutralen pH-Wert und in Abwesenheit von Lysin liegt CadC in einer inaktiven Form vor und wird zusätzlich durch LysP inhibiert. H-NS bildet einen Repressionskomplex innerhalb der regulatorischen Region des *cadBA*-Operons. In Anwesenheit von Lysin wird die LysP-vermittelte Inhibition aufgehoben. Bei niedrigen pH-Werten wird CadC aktiviert und kann als Tetramer zunächst an der starken Bindestelle Cad1 binden, wodurch der Repressorkomplex gelockert und CadC auch in unmittelbare Nähe der schwächeren Bindestelle Cad2 gebracht wird. Die Bindung von CadC an Cad1 erleichtert und stabilisiert die Bindung an die schwächere Bindestelle Cad2,

wodurch der Repressionskomplex aufgelöst wird. Nach der Auflösung des Repressionskomplexes kann die RNA-Polymerase an die -35/-10-Region des *cadBA*-Promotors binden. Von der Bindestelle Cad2 aus stimuliert CadC die RNA-Polymerase und aktiviert so die Transkription des *cadBA*-Operons. Durch die von CadA und CadB katalysierte Lysindecaboxylierung und Cadaverin-Ausschleusung steigt die externe Cadaverin-Konzentration kontinuierlich an. Wenn die externe Cadaverin-Konzentration einen kritischen Wert erreicht hat, wird CadC durch Cadaverin inaktiviert und die *cadBA*-Transkription kommt zum Erliegen.

#### 4.6 Die Funktion des Cad-Systems in der Zelle

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Untersuchung der physiologischen Funktion des Cad-Systems in der Zelle. *E. coli* ist zu einer Adaptation an extremen Säurestress fähig. Für Zellen der logarithmischen Wachstumsphase ist ein schlagartiger Wechsel des pH-Wertes des umgebenden Mediums von pH 7 nach pH 3 tödlich. Wenn die Zellen jedoch zuvor bei einem nicht tödlichen pH-Wert von 5-6 adaptiert wurden, sind sie anschließend auch in der Lage, pH-Werte <3 zu tolerieren (Goodson und Rowbury, 1989). Die Natur dieser induzierbaren Säureadaptation war lange Zeit unklar, doch verschiedene Publikationen der letzten Jahren und unter anderem auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass vor allem die seit langem bekannten Decarboxylase-Systeme für Arginin (Iyer et al., 2003), Glutamat (Castanie-Cornet *et al.*, 1999) und Lysin (Diez-Gonzalez und Karaibrahimoglu, 2004) für diese Adaption verantwortlich sind.

Der Effekt der Lysinaufnahme, Lysindecaboxylierung und Cadaverinexkretion auf den pH-Wert des Mediums war deutlich zu erkennen. Bei der simulierten Magenpassage *in vivo* des Wildtyp-Stamms MG1655 stieg der pH-Wert von 5,5 auf 5,8. Dies ist insofern bemerkenswert, als dass während der Induktionsphase mikroaerophile Bedingungen herrschten und daher die Zellen verstärkt fermentativ Glukose abbauten und organische Säuren in signifikanten Mengen ins Medium abgaben. Bei der simulierten Magenpassage *in vivo* von *E. coli* MG1655- $\Delta cadC$ , der aufgrund einer *cadC*-Deletion nicht in der Lage war, das *cadBA*-Operon zu exprimieren, sank der pH-Wert des Mediums während der Inkubationsphase von 5,5 auf 5,35, offensichtlich aufgrund des fehlenden Cad-Systems. Unter den im Versuch herrschenden Bedingungen hatte dies allerdings keinen signifikanten Einfluss auf die Fitness der Zellen. Sowohl die Teilungsrate als auch die Lebendzellzahl bewegten sich bei beiden Stämmen im selben Bereich. Dies deutet daraufhin, dass das Cad-System zwar bei einem gemäßigten Säurestress induziert wird, aber seine wichtigste Funktion bei wesentlich stärkerem Säurestress hat.

Um dies Hypothese zu testen wurde die Überlebensrate von dem *E. coli* Wildtyp mit der von einer Cad-negativen Mutante verglichen, nachdem die Zellen für 2 h bei pH 3 inkubiert worden waren.

Die Mutante wies dabei eine deutlich niedrigere Überlebensrate auf als der Wildtyp. Durch Zugabe von Cadaverin ins Medium konnte dieser Phänotyp der Cad-negativen Mutante wieder komplementiert werden.

Nach der Inkubation war der pH-Wert des Mediums, in dem der Wildtyp inkubiert wurde, höher als der pH-Wert des Mediums, in dem die Mutante inkubiert wurde. In weiteren Experimenten konnte bestätigt werden, dass vor allem der pH-Wert des Mediums und nicht die Cadaverin-Konzentration selbst die Überlebensrate der Zellen beeinflusst. Der positive Effekt der Cadaverin-Synthese und -Exkretion war also, zumindest bei den hier verwendeten Versuchsanordnungen, auf die Erhöhung des externen pH-Wertes zurückzuführen, und nicht auf die Verringerung der Permeabilität der äußeren Membran oder der Supplementation der Zelle mit CO<sub>2</sub>.

Ein deutlicher Hinweis dafür, dass das Cad-System seine wichtigste Funktion bei extremen Säurestress (pH <3,5) und nicht bei gemäßigttem Säurestress (pH 5-6) hat, ist auch das pH-Optimum der Lysin-Decarboxylase CadA bei 5,6 (Sabo *et al.*, 1974). Bei externen pH-Werten bis etwa 5 sind die konstitutiven pH-Homöostase-Systeme von *E. coli* durchaus in der Lage, den zytoplasmatischen pH-Wert zwischen 7,4 und 7,8 zu regulieren. Bei diesen pH-Werten liegt die Aktivität von CadA nur bei ca. 20% (Lemonnier und Lane, 1998). Hingegen sind bei niedrigeren externen pH-Werten von 3-3,5 die konstitutiven pH-Homöostase-Systeme nicht mehr in der Lage, den neutralen zytoplasmatischen pH-Wert aufrechtzuerhalten. Erst unter sauren Bedingungen im Zytoplasma zeigen CadA und die anderen Aminosäuredecarboxylasen maximale Aktivität.

Dabei zeigt der Vergleich der drei Systeme Cad, Adi und Gad, dass sich die Zelle gegen Säurestress in einem weiten pH-Bereich wappnet. Während das Cad-System seine maximale Aktivität bei einem zytoplasmatischen pH-Wert von 5,6 hat, hat das Adi-System ein pH-Optimum von 5,0 und das Gad-System ein pH-Optimum von 4,0 (Richard und Foster, 2004), so dass bei unterschiedlichen pH-Werten jeweils ein anderes System die "Hauptlast" der Stressantwort übernehmen kann.

Die rasch sinkende Enzymaktivität von CadA bei steigendem pH-Wert dürfte auch eine wichtige autoregulatorische Funktion haben, um eine Alkalisierung des Zytoplasmas zu vermeiden, wenn durch einen nur kurzzeitigen Säurestress die Expression des *cadBA*-Operons aktiviert wurde, die Zellen aber danach wieder in eine Umgebung mit einem neutralen externen pH-Wert zurückkehren.

Die Induktion des Cad-Systems und der anderen Decarboxylase-Systeme bei gemäßigttem Säurestress ist also eigentlich keine Reaktion der Zelle auf die gerade herrschenden Bedingungen, sondern die Zelle bereitet sich auf noch weit schlechtere Bedingungen vor. Wie die im Rahmen dieser Arbeit zur Induktion des Cad-Systems durchgeführten Versuche gezeigt haben, benötigt die Zelle etwa 20 Minuten, um durch die Synthese von CadA und CadB einen potenten Säureschutz zu etablieren. Unter den Bedingungen, die für die maximale Induktion des Cad-Systems verantwortlich

ist, ist die Verdoppelungszeit der Zelle stark verlangsamt. Zusammen mit der beobachteten Stabilität des CadA-Proteins ist dadurch gewährleistet, dass trotz der nur kurzzeitigen Transkription ein relativ lang anhaltender Säureschutz etabliert wird. Mit der Induktion des Cad-Systems und der anderen Aminosäure-Decarboxylase-Systeme bei gemäßigttem Säurestress ist die Zelle einen Kompromiss eingegangen. Rein vom Gesichtspunkt der Säuretoleranz aus gesehen, wäre eine konstitutive Expression des Cad-Systems von Vorteil, weil dadurch die 20 minütige lag-Phase entfallen würde, die für die Expression des Systems bei sinkenden pH-Werten benötigt wird. Diese lag-Phase, in der die Zelle noch über keine extreme Säureresistenz verfügt (wenn sie sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindet), stellt für *E. coli* in seiner natürlichen Umgebung bei Eintritt in den Magen-Darm-Trakt sicherlich ein ernstes Problem dar. Um allerdings einen konstitutiven Schutz während der exponentiellen Wachstumsphase zu generieren, wäre aufgrund der schnellen Zellteilung eine ständige Neusynthese notwendig, um eine für die extreme Säureresistenz kritische Konzentration an CadA und CadB aufrechtzuerhalten. Dies wäre mit einem hohen Energieaufwand für die Zelle verbunden, allein CadA kann bei voller Induktion bis zu 6% des gesamten Zellproteins ausmachen (Sabo *et al.*, 1974). Eine beständige "Energieverschwendung" für die Synthese des Cad-Systems auch bei neutralem pH wäre für die Zelle also wohl nachteiliger, als der kurzzeitige Vorteil, den dies während extremen Säurestresses hätte.

Der Eintritt in die stationäre Phase verleiht *E. coli*-Zellen eine potente, konstitutive Säureresistenz. Für das Gad-System konnte gezeigt werden, dass dieses bei Erreichen der stationären Phase konstitutiv exprimiert wird (Richard und Foster, 2003). Hingegen ist das Cad-System nicht in diese konstitutive Säureresistenz involviert, wie in den Induktionsexperimenten gezeigt werden konnte. Auch bei Zellen in der stationären Phase muss die *cadBA*-Expression erst durch niedrigen pH, Lysin und O<sub>2</sub>-Mangel ko-induziert werden. Die bevorzugte Rolle des Gad-Systems hängt möglicherweise mit der zentralen Rolle von Glutamat im Aminosäurestoffwechsel zusammen.

#### 4.7 Ausblick

Für eine weitere Verfeinerung des *in silico*-Modells des Cad-Systems wäre eine genauere Charakterisierung der Lysin-induzierten Aktivierung und der Cadaverin-induzierten Inaktivierung wichtig. Eine mögliche direkte Bindung von Lysin und Cadaverin an CadC und die Bestimmung der Bindungskonstanten könnte durch biochemische Methoden wie Messungen der Tryptophan-Fluoreszenz oder der Isothermalen Titrationskalorimetrie (ITC) erfolgen. Erste Messungen wurden bereits durchgeführt und deuten daraufhin, dass es eine Bindung von Cadaverin an CadC geben könnte. Protein-Protein-Interaktionen zwischen CadC und LysP könnten durch Ko-Elutionsexperimente, Two-Hybrid-Messungen oder durch Biomolekulare Interaktions-Messungen analysiert werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Deletionsanalysen der regulatorischen Region des *cadBA*-Operons indizierten die Existenz von zwei Bindestellen für den globalen Repressor H-NS stromaufwärts der *cadBA*-Promotorregion. Weitere potentielle Bindestellen innerhalb der Promotorregion geben Hinweise darauf, dass das *cadBA*-Operon durch einen „Klammermechanismus“ von H-NS reprimiert werden könnte. Alternativ wäre aber auch eine Repression nur von den stromaufwärts gelegenen H-NS Bindestellen aus möglich. Da eine Bindung von H-NS an die potentiellen Bindestellen „H-NS4“ und „H-NS5“, die innerhalb der *cadBA*-Promotorregion liegen, durch Deletionsanalysen nicht nachzuweisen ist, müsste die Bindung von H-NS an diese Seiten durch DNA-Bindeexperimente *in vitro* verifiziert werden. Des weiteren könnte durch Bindeexperimente mit dem Regulator ArcA analysiert werden, ob dieser an der Auflösung des H-NS vermittelten Repressionskomplexes unter anaeroben Bedingungen beteiligt ist. Für ein besseres Verständnis des Aktivierungsmechanismus und der Signaltransduktion von CadC könnten Informationen zur Tertiärstruktur von großen Nutzen sein. Diese beziehen sich bisher nur auf die DNA-bindende N-terminale Domäne. Vergleiche der Aminosäuresequenz der C-terminalen Domäne mit den gängigen Datenbanken zeigten keine Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinstrukturen. Da die C-terminale Domäne für die Reizwahrnehmung und die Oligomerisierung essentiell ist, wären gerade hier strukturelle Informationen sehr wichtig. CadC ist bislang das einzige Mitglied der ToxR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren, das gereinigt und rekonstituiert werden konnte. Mögliche konformationelle Änderungen in der periplasmatischen Domäne von CadC in Abhängigkeit vom pH-Wert könnten durch Kristallisation dieser Domäne bei unterschiedlichen pH-Werten analysiert werden.



## 5. Zusammenfassung

Das Cad-System von *Escherichia coli* gehört zu den pH-induzierbaren Aminosäuredecarboxylase-Systemen. Der Aktivator des Cad-Systems ist der membrangebundene Transkriptionsregulator CadC. CadC ist gleichzeitig Sensor für die Umweltreize pH und Lysin und Effektorprotein, das die Expression des *cadBA*-Operons induziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden der molekulare Mechanismus der transkriptionellen Aktivierung des *cadBA*-Operons durch CadC und verschiedene Modelle für die Aktivierung eines membranintegrierten Transkriptionsaktivators untersucht.

- ◆ Durch Footprint-Analysen konnten innerhalb der regulatorischen Region des *cadBA*-Operons die zwei CadC-Bindestellen Cad1 (erstreckt sich von bp -150 bis -112, relativ zum Transkriptionsstart des *cadBA*-Operons) und Cad2 (bp -89 bis -59) identifiziert werden. DNA-Bindeexperimente *in vitro* zeigten, dass CadC mit einer höheren Affinität an Cad1 als an Cad2 bindet. Die Affinität von CadC zu Cad1 und Cad2 wurde durch unterschiedliche pH-Werte oder durch Lysin und Cadaverin nicht signifikant beeinflusst. Die Analyse der Bindestellen Cad1 und Cad2 *in vivo* ergab, dass das Vorhandensein beider Bindestellen für die Induktion der *cadBA*-Expression durch Lysin und einen niedrigen externen pH-Wert essentiell ist.
- ◆ Die Repression des *cadBA*-Operons unter nicht-induzierenden Bedingungen durch den globalen Repressor H-NS wurde untersucht. Deletionsanalysen der regulatorischen Region des *cadBA*-Operons indizierten zwei H-NS-Bindestellen stromaufwärts der CadC-Bindestellen. Rechnergestützte Sequenzanalysen legen die Existenz von zwei weiteren H-NS-Bindestellen nahe, die mit den CadC-Bindestellen und der -35/-10-Region von  $P_{Cad}$  überlappen. In *hns* Deletionsstämmen war die *cadBA*-Expression sowohl unter induzierenden als auch unter nicht-induzierenden Bedingungen signifikant erhöht. Für die Aktivierung des *cadBA*-Operons war CadC essentiell.
- ◆ Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zum Oligomerisationszustand von CadC indizierten, dass CadC Tetramere ausbildet. Die periplasmatische Domäne war für die Oligomerisierung von CadC essentiell. Die Tetramere traten sowohl unter induzierenden als auch unter nicht-induzierenden Bedingungen auf. Daher scheint eine Aktivierung von CadC durch eine Oligomerisierung von CadC-Monomeren, die durch Umgebungsbedingungen wie den pH-Wert und die Lysin-Konzentration moduliert wird, unwahrscheinlich.

- ◆ Basierend auf den oben angeführten Daten wurde ein Modell für die transkriptionelle Aktivierung des *cadBA*-Operons entwickelt. Demzufolge bildet H-NS unter nicht-induzierenden Bedingungen innerhalb der regulatorischen Region des *cadBA*-Operons einen Repressionskomplex. Unter induzierenden Bedingungen bindet CadC als Tetramer zunächst an die Bindestelle Cad1, wodurch die anschließende Bindung an Cad2 erleichtert und stabilisiert wird. Durch die Bindung von CadC wird der H-NS vermittelte Repressionskomplex aufgelöst, wodurch eine Interaktion der RNA-Polymerase mit der -35/-10-Region von  $P_{\text{Cad}}$  und die *cadBA*-Transkription ermöglicht werden.
- ◆ Verschiedene membranintegrierte Transkriptionsfaktoren in eukaryontischen Zellen werden durch eine Regulierte Proteolyse (RP) aktiviert. Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zum molekularen Mechanismus des membran-integrierten Transkriptionsaktivators CadC ergaben bisher keine Hinweise darauf, dass CadC unter induzierenden Bedingungen durch einen Mechanismus ähnlich den der Regulierten Proteolyse aktiviert wird.
- ◆ Um die Funktion der Transmembrandomäne und der periplasmatischen Domäne für die Aktivierung von CadC genauer zu analysieren, wurden verschiedene C-terminal verkürzte CadC-Derivate hinsichtlich ihrer Funktionalität untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine Membranassoziation oder -integration von CadC für die Induktion der *cadBA*-Expression notwendig war. Des Weiteren war die periplasmatische Domäne für die CadC-Aktivierung essentiell.
- ◆ In Zusammenarbeit mit dem Department für Physik der LMU München wurde ein *in silico* Modell für die Regulation der *cadBA*-Expression erstellt. Zur Überprüfung des Modells wurde die Expression des Cad-Systems während einer simulierten Magen-Passage *in vivo* analysiert. Die experimentellen Daten stimmten mit dem Modell sehr gut überein. Das Modell ist also in der Lage, die *in vivo*-Daten zu abzubilden.
- ◆ Es konnte nachgewiesen werden, dass das Cad-System eine wichtige Funktion für die Säureresistenz von *E. coli* bei extremen Säurestress bei pH-Werten  $<3$  hat. Dieser Effekt ist vor allem auf die pH-Wert steigernde Wirkung von ausgeschleustem Cadaverin zurückzuführen. Bei mildem Säurestress bis pH 5 erfüllt das Cad-System vermutlich keine wichtige Funktion.

## 6. Literatur

- Ades, S. E., Connolly, L.E., Alba, B.M., Gross, C.A. (1999):** The *Escherichia coli*  $\sigma^E$ -dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti- $\sigma$  factor. *Genes Dev.* (13): 2449–2461.
- Aiba, H., Adhya, S., de Crombrughe, B. (1981):** Evidence for two functional *gal* –promoters in intact *Escherichia coli* cells, *J. Bacteriol.* (256): 11905-11910.
- Alba, B.M., Leeds, J.A., Onufryk, C., Lu, C.Z., Gross, C.A. (2002):** DegS and YaeL participate sequentially in the cleavage of RseA to activate the  $\sigma^E$  dependent extracytoplasmic stress response. *Genes Dev.* (16): 2156–68
- Applebaum, D.M., Dunlop, J.C., Morris, D.R. (1977):** Comparison of the biosynthetic and degradative ornithine decarboxylases of *Escherichia coli*. *Biochemistry* (16): 1580-1584.
- Auger E.A., Bennett G.N. (1989):** Regulation of lysine decarboxylase activity in *Escherichia coli* K-12. *Archives of Microbiology* (151): 466-468.
- Bakker, E.P., Mangerich, W.E. (1981):** Interconversion of components of the bacterial proton motive force by electrogenic potassium transport. *J. Bacteriol.* (147): 820-826.
- Bearson, S., Bearson, B., Foster, J.W. (1997):** Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* (147): 173-180.
- Blanco, A.G., Sola, M., Gomis-Rüth, F.X., Coll, M. (2002):** Tandem DNA Recognition by PhoB, a Two-Component Signal Transduction Transcriptional Activator. *Structure* (10): 701-713.
- Blattner F.R., Plunkett G., Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., ColladoVides J., Glasner J.D., Rode C.K., Mayhew G.F., Gregor J., Davis N.W., Kirkpatrick H.A., Goeden M. A., Rose D.J., Mau B., Shao Y. (1997):** The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* (277): 1453-1474.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J. (1987):** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* (8): 93-99.
- Bocker, E.A., Snell, E.E. (1972):** Amino acid decarboxylases. 217–253. *In* P. Boyer (ed.), *The enzymes*, vol. 6. Academic Press, New York, N.Y.
- Böhm A., Boos W. (2004):** Gene regulation in prokaryotes by subcellular relocalization of transcription factors. *Curr. Opin. Microbiol.* (7): 151-156.
- Booth I.R. (1985):** Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Rev.* (49): 359-378.
- Bradford M.M., Williams W.L. (1976):** New, rapid, sensitive method for protein determination. *Federation Proceedings* (35): 274.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J.R., Cumano, A., Roux, P., Black, R.A., Israel, A. (2000):** A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol. Cell* (5): 207-216.

- Cortassa, S., Aon, M.A. (1993):** Altered topoisomerase activities may be involved in the regulation of DNA supercoiling in aerobic-anaerobic transitions in *Escherichia coli*. *Mol. Cell. Biochem.* (126): 115–124.
- Casabadan, M.J., Cohen, S.N. (1979):** Lactose genes fused to toxic promoters in one step using a Mu-*lac* bacteriophage: *in vivo* probe for transcriptional control sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (76): 4530-4534
- Castanie-Cornet M.P., Penfound T.A., Smith D., Elliott J. F., Foster J.W. (1999):** Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* (181): 3525-3535.
- Chen J., Matthews K.S. (1992):** Deletion of lactose repressor carboxyl-terminal domain affects tetramer formation. *J. Biol. Chem.* (267): 13843-13850.
- Crawford, J.A., Kaper, J.B., DiRita, V.J. (1998):** Analysis of ToxR-dependent transcription activation of *ompU*, the gene encoding a major envelope protein in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* (29): 235-246.
- Crawford J.A., Krukonis E.S., DiRita V.J. (2003):** Membrane localization of the ToxR winged-helix domain is required for TcpP-mediated virulence gene activation in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* (47): 1459-1473.
- Cunningham, B.C., Ultsch, M., De Vos, A.M., Mulkerin, M.G., Clauser, K.L., Wells, J.A. (1991):** Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. *Science* (254): 821-825.
- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J. *et al.*, (1999):** A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* (398): 518–22.
- Dell C.L., Neely M.N., Olson E.R. (1994):** Altered pH and lysine signalling mutants of *cadC*, a gene encoding a membrane-bound transcriptional activator of the *Escherichia coli cadBA* operon. *Mol. Microbiol.* (14): 7-16.
- Dersch P., Schmidt K., Bremer E.. (1993):** Synthesis of the *Escherichia coli* K-12 nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS is subjected to growth-phase control and autoregulation. *Mol. Microbiol.* (8): 875-889.
- Diez-Gonzalez F., Karaibrahimoglu Y. (2004):** Comparison of the glutamate-, arginine- and lysine-dependent acid resistance systems in *Escherichia coli* O157 : H7. *Journal of Applied Microbiology* (96): 1237-1244.
- Dorman C.J. (2004):** H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat. Rev. Microbiol.* (2): 391-400.
- Dorman C.J., Barr G.C., Bhriain N.N., Higgins C.F. (1988):** DNA supercoiling and the anaerobic and growth phase regulation of *tonB* gene expression. *J. Bacteriol.* (170): 2816-2826.
- Dosch, D.C., Helmer, G.L., Sutton, S.H., Salvacion, F.F., Epstein, W. (1991):** Genetic analysis of potassium transport loci in *Escherichia coli*: Evidence for three constitutive systems mediating uptake of potassium. *J. Bacteriol.* (173): 687-696.

- Dziejman M., Kolmar H., Fritz H. J., Mekalanos J.J. (1999):** ToxR co-operative interactions are not modulated by environmental conditions or periplasmic domain conformation. *Mol. Microbiol.* (31): 305-317.
- Dziejman, M., Mekalanos, J. (1994):** Analysis of membrane protein interactions: ToxR can dimerize the aminotermminus of lambda repressor. *Mol. Microbiol.* (13): 485–494.
- Egan S., James S., Kjelleberg S. (2002):** Identification and characterization of a putative transcriptional regulator controlling the expression of fouling inhibitors in *Pseudoalteromonas tunicata*. *Appl. Environ. Microbiol.* (68): 372-378.
- Ellis, J., Carlin, A., Steffes, C., Wu, J., Rosen, B.P. (1995):** Topological analysis of the lysine-specific permease of *Escherichia coli*. *Microbiol.* (141): 1927-1935.
- Epstein, W., Kim, B.S. (1971):** Potassium transport loci in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* (108): 639-644.
- Falconi M., Prosseda G., Giangrossi M., Beghetto E., Colonna B. (2001):** Involvement of FIS in the H-NS-mediated regulation of *virF* gene of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* (42): 439-452.
- Fried, M., Crothers, D.M. (1981):** Equilibria and kinetics of *lac* repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* (9): 6505-6525.
- Futatsugi L., Saito H., Kakegawa T., Kobayashi H. (1997):** Growth of an *Escherichia coli* mutant deficient in respiration. *FEMS Microbiol. Lett.* (156): 141-145.
- Gajiwala, K. S., Burley, S. K. (2000):** HdeA, a periplasmic protein that supports acid resistance in pathogenic enteric bacteria. *J. Mol. Biol.* (295): 605–612.
- Gale, E.F., Epps, H.M.R. (1942):** The effect of the pH of the medium during growth on the enzymatic activities of bacteria (*Escherichia coli* and *Micrococcus lysodeikticus*) and the biological significance of the changes produced. *Biochem. J.* (36): 600-619
- Gale, E.F. (1946):** The bacterial amino acid decarboxylases. *Adv. Enzymol.* (6): 1-32
- Giangrossi, M., Zattoni, S., Tramonti, A., De Biase, D., Falconi, M. (2005):** Antagonistic Role of H-NS and GadX in the Regulation of the Glutamate Decarboxylase-dependent Acid Resistance System in *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* (280): 21498-21505.
- Görke, B., Reinhardt, J., Rak, B. (2005):** Activity of Lac repressor anchored to the *Escherichia coli* inner membrane. *Nucleic Acids Res.* (33): 2504-2511.
- Gong S., Richard H., Foster J.W. (2003):** YjdE (AdiC) is the arginine:agmatine antiporter essential for arginine-dependent acid resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* (185): 4402-4409.
- Goodsell D.S., Dickerson R.E. (1994):** Bending and curvature calculations in B-DNA. *Nucleic Acids Res.* (22): 5497-5503.
- Goodson, M., Rowbury, R.J. (1989):** Habituation to normally lethal acidity by prior growth of *Escherichia coli* at a sub-lethal acid pH value. *Lett. Appl. Microbiol.* (8): 77–79.

- Guzman, L.-M., Belin, D., Carson, M.J., Beckwith, J. (1995):** Tight regulation, modulation and high-level-expression by vectors containing the arabinose P<sub>BAD</sub> promoter. *J. Bacteriol.* (177): 4121-4130
- Hase C.C., Mekalanos J.J. (1998):** TcpP protein is a positive regulator of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (95): 730-734.
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K. (1999):** Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* (10): 3787-3799.
- Herring C.D., Glasner J.D., Blattner F.R. (2003):** Gene replacement without selection: regulated suppression of amber mutations in *Escherichia coli*. *Gene* (311): 153-163.
- Hersh B.M., Farooq F.T., Barstad D.N., Blankenhorn D.L., Slonczewski J.L. (1996):** A glutamate-dependent acid resistance gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* (178): 3978-3981.
- Hommais F., Krin E., Coppee J.Y., Lacroix C., Yeramian E., Danchin A., Bertin P. (2004):** GadE (YhiE): a novel activator involved in the response to acid environment in *Escherichia coli*. *Microbiology* (150): 61-72.
- Hu J.C., O'Shea E.K., Kim P.S., Sauer R.T. (1990):** Sequence requirements for coiled-coils: analysis with lambda repressor-GCN4 leucine zipper fusions. *Science* (250): 1400-1403.
- Hurwitz, D.R., Emanuel, S.L., Nathan, M.H., Sarver, N., Ullrich, A., Felder, S., Lax, I., Schlessinger, J. (1991):** EGF induces increased ligand binding affinity and dimerization of soluble epidermal growth factor (EGF) receptor extracellular domain. *J. Biol. Chem.* (266): 22035-22043.
- Iyer R., Williams C., Miller C. (2003):** Arginine-aggmatine antiporter in extreme acid resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* (185): 6556-6561.
- Jones H.M., Gunsalus R.P. (1987):** Regulation of *Escherichia coli* fumarate reductase (*frdABCD*) operon expression by respiratory electron acceptors and the *fnr* gene product. *J. Bacteriol.* (169): 3340-3349.
- Jung, K., Tjaden, B, Altendorf, K. (1997):** Purification, reconstitution and characterization of KdpD, the turgor sensor of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem* (272): 10847-10852.
- Krukonis E.S., Yu R.R., DiRita V.J. (2000):** The *Vibrio cholerae* ToxR/TcpP/ToxT virulence cascade: distinct roles for two membrane-localized transcriptional activators on a single promoter. *Mol. Microbiol.* (38): 67-84.
- Kanehara K., Ito K., Akiyama Y. (2002):** YaeL (EcfE) activates the pathway of stress response through a site-2 cleavage of anti- $\sigma^S$ , RseA. *Genes Dev.* (16): 2147-2155.
- Kolibachuk D., Greenberg E.P. (1993):** The *Vibrio fischeri* luminescence gene activator LuxR is a membrane-associated protein. *J. Bacteriol.* (175): 7307-7312.
- Kolmar H., Hennecke F., Gotze K., Janzer B., Vogt B., Mayer F., Fritz H.J. (1995):** Membrane insertion of the bacterial signal transduction protein ToxR and requirements of transcription activation studied by modular replacement of different protein substructures. *EMBO J.* (14): 3895-3904.

- Küper, C. (2001):** Molekulare Analyse des Transkriptionsaktivators CadC von *Escherichia coli*. Diplomarbeit, Universität Osnabrück
- Laemmli, U.K. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* (259): 680-685
- Leder, P., Tiemeier, D., Enquist, L. (1977):** EK2 derivatives of bacteriophage lambda useful in the cloning of DNA from higher organisms: the lambda gt WES system. *Science* (196): 175-177.
- Lemonnier M., Lane D. (1998):** Expression of the second lysine decarboxylase gene of *Escherichia coli*. *Microbiology* (144): 751-760.
- Li, C.C., Merrell, D.S., Camilli, A., Kaper, J.B. (2002):** ToxR interferes with CRP-dependent transcriptional activation of *ompT* in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* (43): 1577-1589.
- Lieber, T., Kidd, S., Alcamo, E., Corbin, V., Young, M.W. (1993):** Antineurogenic phenotypes induced by truncated Notch proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function for Notch in nuclei. *Genes. Dev.* (7): 1949-1965.
- Liu X., de Wulf. P. (2004):** Probing the ArcA-P modulon of *Escherichia coli* by whole genome transcriptional analysis and sequence recognition profiling. *J. Biol. Chem.* (279): 12588-12597.
- Lowen, P. C., R. Hengge-Aronis (1994):** The role of the sigma factor  $\sigma^s$  (KatF) in bacterial global regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* (48): 53–80.
- Ma Z., Gong S., Richard H., Tucker D.L., Conway T., Foster J.W. (2003):** GadE (YhiE) activates glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* (49): 1309-1320.
- Ma Z., Richard H., Tucker D.L., Conway T., Foster J. W. (2002):** Collaborative regulation of *Escherichia coli* glutamate-dependent acid resistance by two AraC-like regulators, GadX and GadW (YhiW). *J. Bacteriol.* (184): 7001-7012.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1989):** Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Martinez-Hackert E., Stock A.M. (1997):** Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors. *J. Mol. Biol.* (269): 301-312.
- Maurer, L.M., Yohannes, E., Bondurant, S.S., Radmacher, M., Slonczewski, J.L. (2005):** pH Regulates Genes for Flagellar Motility, Catabolism, and Oxidative Stress in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* (187): 304-319.
- Meng S.Y., Bennett G.N. (1992a):** Nucleotide Sequence of the *Escherichia coli cad* Operon: A System for Neutralization of low Extracellular pH. *J. Bacteriol.* (174): 2659-2669.
- Meng S.Y., Bennett G.N. (1992b):** Regulation of the *Escherichia coli cad* Operon - Location of a Site required for Acid Induction. *J. Bacteriol.* (174): 2670-2678.
- Merrell D.S., Camilli A. (2000):** Regulation of *Vibrio cholerae* genes required for acid tolerance by a member of the "ToxR-like" family of transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* (182): 5342-5350.

- Miller V.L., Taylor R.K., Mekalanos J.J. (1987):** Cholera toxin transcriptional activator *toxR* is a transmembrane DNA binding protein. *Cell* (48): 271-279.
- Miller J. H. (1972):** Experiments in molecular genetic. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Milligan, D.L., Koshland, D.E. (1988):** Site-directed cross-linking. Establishing the dimeric structure of the aspartate receptor of bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.* (263): 6268-6275.
- Niwa, M., Sidrauski, C., Walter, P. (1999):** A role for presenilin-1 in nuclear accumulation of I $\epsilon$ 1 fragments and induction of the mammalian unfolded protein response. *Cell* (99): 691-702.
- Neely M.N., Dell C.L., Olson E.R. (1994):** Roles of LysP and CadC in mediating the lysine requirement for acid induction of the *Escherichia coli cad* operon. *J. Bacteriol.* (176): 3278-3285.
- Neely M.N., Olson E.R. (1996):** Kinetics of expression of the *Escherichia coli cad* operon as a function of pH and lysine. *J. Bacteriol.* (178): 5522-5528.
- Nye, B.M., Pfau, J.D., Skorpuski, K., Taylor, R.K. (2000):** *Vibrio cholerae* H-NS Silences Virulence Gene Expression at Multiple steps in the ToxR Regulatory Cascade. *J. Bacteriol.* (182): 4295-4303.
- Oberg, C., Li, J., Pauley, A., Wolf, E., Gurney, M., Lendahl, U. (2001):** The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Sel-10 homolog. *J. Biol. Chem.* (276): 847-53.
- Okamura H., Hanaoka S., Nagadoi A., Makino K., Nishimura Y. (2000):** Structural comparison of the PhoB and OmpR DNA-binding/transactivation domains and the arrangement of PhoB molecules on the phosphate box. *J. Mol. Biol.* (295): 1225-1236.
- Ostrovsky de S.P., Maloy S. (1993):** PutA protein, a membrane-associated flavin dehydrogenase, acts as a redox-dependent transcriptional regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (90): 4295-4298.
- Ottemann, K.M., Mekalanos, J.J. (1995):** Analysis of *Vibrio cholerae* ToxR function by construction of novel fusion proteins. *Mol. Microbiol.* (15): 719-731.
- Ottemann, K.M., Mekalanos, J.J. (1996):** The ToxR protein of *Vibrio cholerae* forms homodimers and heterodimers. *J. Bacteriol.* (178): 156-162.
- Owen-Hughes, T.A., Pavitt G.D., Santos, D.S., Sidebotham, J.M., Hulton, C.S.J., Hinton, J.C.D., Higgins, C.F. (1992):** The chromatin-associated protein H-NS interacts with curved DNA to influence DNA topology and gene expression. *Cell.* (71): 255-265.
- Peterson, G.L. (1977):** A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* (83): 346-356
- Phan, A.P.H., Ngo, T.T., Lenhoff, H.M. (1982):** Spectrophotometric assay for lysine decarboxylase. *Anal Biochem* (120): 193-197.
- Plumbridge J. (2002):** Regulation of gene expression in the PTS in *Escherichia coli*: the role and interactions of Mlc. *Curr. Opin. Microbiol.* (5): 187-193.



- Popkin, P.S., Maas, W.K. (1980):** *Escherichia coli* Regulatory Mutation Affecting Lysine Transport and Lysine Decarboxylase. *J. Bacteriol.* (141): 485-492
- Popov N., Schmitt M., Schulzeck S., Matthies H. (1975):** Reliable micromethod for determination of the protein content in tissue homogenates. *Acta. Biol. Med. Ger.* (34): 1441-1446.
- Promega (1994):** Technical manual: Altered sites II *in vitro* mutagenesis systems.
- Qin Y., Luo Z.Q., Smyth A.J., Gao P., von Beck B.S., Farrand S.K. (2000):** Quorum-sensing signal binding results in dimerization of TraR and its release from membranes into the cytoplasm. *EMBO J.* (19): 5212-5221.
- Rand, M.D., Grimm, L.M., Artavanis-Tsakonas, S., Patriub, V., Blacklow, S.C., Sklar, J., Aster, J.C. (2000):** Calcium depletion dissociates and activates heterodimeric notch receptors. *Mol. Cell. Biol.* (20): 1825-1835.
- Reams S.G., Lee N., Mat-Jan F., Clark D.P. (1997):** Effect of chelating agents and respiratory inhibitors on regulation of the *cadA* gene in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* (167): 209-216.
- Rhee J.E., Rhee J.H., Ryu P.Y., Choi S.H. (2002):** Identification of the *cadBA* operon from *Vibrio vulnificus* and its influence on survival to acid stress. *FEMS Microbiol. Lett.* (208): 245-251.
- Rhee J.E., Kim, K.-S., Choi S.H. (2002):** CadC Activates pH-Dependent Expression of the *Vibrio vulnificus cadBA* Operon at a Distance through Direct Binding to an Upstream Region. *J. Bacteriol.* (187): 7870-7875.
- Rhoads, D.B., Waters, F.B., Epstein, W. (1976):** Cation transport in *Escherichia coli*. VIII. Potassium transport mutants. *J. Gen. Physiol.* (67): 325-341.
- Richard H., Foster J.W. (2004):** *Escherichia coli* glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential. *J. Bacteriol.* (186): 6032-6041.
- Richard H.T., Foster J.W. (2003):** Acid resistance in *Escherichia coli*. *Adv. Appl. Microbiol.* (52): 167-186.
- Rigaud, J.-L., Pitard, B., Levy, D. (1995):** Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* (1231): 223-246
- Sabo D.L., Boeker E.A., Byers B., Waron H., Fischer E.H. (1974):** Purification and physical properties of inducible *Escherichia coli* lysine decarboxylase. *Biochemistry* (13): 662-670.
- Sandaltzopoulos R., Ansorge W., Becker P.B., Voss H. (1994):** Nonradioactive, solid-phase DNase I footprints analyzed on an A.L.F. DNA Sequencer. *Biotechniques* (17): 474-478.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977):** DNA Sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (74): 5463-5467.
- Samartzidou H., Delcour A.H. (1999):** Excretion of endogenous cadaverine leads to a decrease in porin-mediated outer membrane permeability. *J. Bacteriol.* (181): 791-798.

- Samartzidou H., Mehrazin M., Xu Z., Benedik M. J., Delcour A. H. (2003):** Cadaverine inhibition of porin plays a role in cell survival at acidic pH. *J. Bacteriol.* (185): 13-19.
- Schell M.A. (1993):** Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* (47): 597-626.
- Siebers, A., Altendorf, K. (1988):** The K<sup>+</sup>-translocating Kdp-ATPase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* (178): 131-140.
- Shi X.L., Waasdorp B.C., Bennett G.N. (1993):** Modulation of acid induced amino-acid decarboxylase gene expression by H-NS in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* (175): 1182-1186.
- Shi, X., Bennett, G.N. (1994):** Effects of *rpoA* and *cysB* mutations on acid induction of biodegradative arginine decarboxylase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* (176): 7017–7023.
- Simons R.W., Houman F., Kleckner N. (1987):** Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* (53): 85-96.
- Slonczewski, J.L., Rosen, B.P., Alger, J.R., Castle, A.M. (1982):** pH homeostasis in *Escherichia coli*: measurement by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance of methylphosphonate and phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (78): 6271-6275.
- Slonczewski, J.L., Foster, J.W. (1996):** pH-regulated genes and survival at extreme pH, Aus: *Escherichia coli and Salmonella*. Cellular and molecular biology. 2. Ausg., F. Neidhardt (Hrsg.), 1539-1549
- Smith, D.K., Kassam, T, Singh, B., Elliott, J.F. (1992):** *Escherichia coli* has two homologous glutamate decarboxylase genes that map to distinct loci. *J. Bacteriol.* (174): 5820–5826.
- Soksawatmaekhin W., Kuraishi A., Sakata K., Kashiwagi K., Igarashi K. (2004):** Excretion and uptake of cadaverine by CadB and its physiological functions in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* (51): 1401-1412.
- Spassky, A., Rimsky, S., Garreau, H., Buc, H. (1984):** H1a, an *E. coli* DNA-binding protein which accumulates in stationary phase, strongly compacts DNA *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* (12): 5321-5340.
- Stim K.P., Bennett G.N. (1993):** Nucleotide sequence of the *adi* gene, which encodes the biodegradative acid-induced arginine decarboxylase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* (175): 1221-1234.
- Stim-Herndon, K. P., Flores, T. M., G. N. Bennett (1996):** Molecular characterization of *adiY*, a regulatory gene which affects expression of the biodegradative acid-induced arginine decarboxylase (*adiA*) of *Escherichia coli*. *Microbiology* (142): 1311–1320.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Dubendorff, J.W. (1990):** Use of T7 RNA polymerase to Direct Expression of Cloned Genes. (*Meth. in Enzym*): 185, 60-89
- Studier, F.W., Moffat, B. (1986):** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* (189): 113-130

- Tabor, H., Haffner, E.W., Tabor, C.W. (1980):** Construction of an *Escherichia coli* strain Unable to Synthesize Putrescine, Spermidine, or Cadaverine: Characterization of Two Genes Controlling Lysine Decarboxylase. *J. Bacteriol.* (144): 952-956.
- Takayama M., Ohyama T., Igarashi K., Kobayashi H. (1994):** *Escherichia coli cad* operon functions as a supplier of carbon dioxide. *Mol. Microbiol.* (11): 913-918.
- Tippner, D., Afflerbach, H., Bradaczek, C., Wagner, R. (1994):** Evidence for a regulatory function of the histone-like *Escherichia coli* protein H-NS in ribosomal RNA synthesis. *Mol. Microbiol.* (11): 589-604.
- Tobe, T., Yoshikawa, M., Mizuno, T., Sasakawa, C. (1993):** Transcriptional control of the invasion regulatory gene *virB* of *Shigella flexneri*: activation by VirF and repression by H-NS. *J. Bacteriol.* (175): 6142-6149.
- Watson N., Duniak D.S., Rosey E.L., Slonczewski J.L., Olson E.R. (1992):** Identification of elements involved in transcriptional regulation of the *Escherichia coli cad* operon by external pH. *J. Bacteriol.* (174): 530-540.
- Weber, K., Osborn, M. (1969):** The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* (244): 4406-4412.
- White, S., Tuttle, F.E., Blankenhorn, D., Dosch, C., Slonczewski, J.L. (1992):** pH dependence and gene structure of *inaA* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* (174): 1537-1543
- Yang, Y., Isberg, R.R. (1997):** Transcriptional regulation of the *Yersinia pseudotuberculosis* pH 6 antigen adhesin by two envelope-associated components. *Mol. Microbiol.* (24): 499-510
- Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. (1985):** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* (33): 103-119.
- Zilberstein, D., Agmon, V., Schuldiner, S., Padan, E. (1984):** *Escherichia coli* intracellular pH, membrane potential, and cell growth. *J. Bacteriol.* (158): 246-252.
- Zeng, X., Hu, J.C. (1997):** Detection of tetramerization domains *in vivo* by cooperative DNA binding to tandem lambda operator sites. *Gene* (185): 245-249.

## Anhang

Tab. 1: Für das mathematische Modell des Cad-Systems verwendete Funktionen

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}[CadC] &= -k_1 [LysP] [CadC] + k_2 [l_{ex}] [LysP \cdot CadC] \\ &\quad - k_3 [H_{ex}^+] [CadC] + k_4 [c_{ex}] [CadC^*] + k_{23} [CadC^*] \end{aligned} \quad (1)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}[CadC^*] &= -k_4 [c_{ex}] [CadC^*] + k_5 [l_{ex}] [LysP \cdot CadC^*] \\ &\quad + k_3 [H_{ex}^+] [CadC] - k_{23} [CadC^*] \end{aligned} \quad (2)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}[LysP \cdot CadC] &= k_1 [LysP] [CadC] - k_2 [l_{ex}] [LysP \cdot CadC] \\ &\quad - k_6 [H_{ex}^+] [LysP \cdot CadC] + k_{24} [LysP \cdot CadC] \end{aligned} \quad (3)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}[LysP \cdot CadC^*] &= k_6 [H_{ex}^+] [LysP \cdot CadC] - k_5 [l_{ex}] [LysP \cdot CadC^*] \\ &\quad - k_{24} [LysP \cdot CadC] \end{aligned} \quad (4)$$

$$\frac{d}{dt}[cadBA] = \frac{k_7 [CadC^*]^2}{[CadC^*]^2 + k_8} - k_9 [cadBA] \quad (5)$$

$$\frac{d}{dt}[CadA] = k_{10} [cadBA] - k_{11} [CadA] \quad (6)$$

$$\frac{d}{dt}[CadB] = k_{12} [cadBA] - k_{13} [CadB] \quad (7)$$

$$\frac{d}{dt}[l_{ex}] = -f_{anti} - k_{14} [LysP] [l_{ex}] \quad (8)$$

$$\frac{d}{dt}[c_{ex}] = f_{anti} \quad (9)$$

$$\frac{d}{dt}[H_{ex}^+] = -f_{anti} - k_3 [H_{ex}^+]^2 [CadC] \quad (10)$$

$$\frac{d}{dt}[l_{in}] = f_{anti} - k_{15} [CadA] [l_{in}] [H_{in}^+] + k_{14} [LysP] [l_{ex}] \quad (11)$$

$$\frac{d}{dt}[c_{in}] = -f_{anti} + k_{15} [CadA] [l_{in}] [H_{in}^+] \quad (12)$$

$$\frac{d}{dt}[H_{in}^+] = f_{anti} - k_{15} [CadA] [l_{in}] [H_{in}^+] \quad (13)$$

$$\frac{d}{dt}[lysP] = \frac{k_{16}}{1 + \frac{[l_{in}]}{k_{17}}} - k_{18} [lysP] \quad (14)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}[LysP] &= k_{19} [lysP] - k_{20} [LysP] + k_5 [l_{ex}] [LysP \cdot CadC^*] \\ &\quad - k_1 [LysP] [CadC] + k_2 [l_{ex}] [LysP \cdot CadC] \end{aligned} \quad (15)$$

$$f_{anti}([CadB], [c_{in}], [H_{ex}^+], [l_{ex}]) = \frac{k_{21} [c_{in}] [CadB] [H_{ex}^+] [l_{ex}]}{[H_{ex}^+] [l_{ex}] + k_{22}} \quad (16)$$

**Tab. 2: Erläuterung der in Tab.1 verwendeten Abkürzungen**

[ <i>cadBA</i> ]:	Konzentration der <i>cadBA</i> mRNA
[CadA]:	Konzentration CadA
[CadB]:	Konzentration CadB
[CadC*]:	Konzentration aktives CadC
[ <i>l<sub>in</sub></i> ]:	intrazelluläre Lysin-Konzentration
[ <i>C<sub>in</sub></i> ]:	intrazelluläre Cadaverin-Konzentration
[ <i>H<sup>+</sup><sub>in</sub></i> ]:	intrazelluläre H <sup>+</sup> -Ionen-Konzentration
[ <i>l<sub>ex</sub></i> ]:	extrazelluläre Lysin-Konzentration
[ <i>C<sub>ex</sub></i> ]:	extrazelluläre Cadaverin-Konzentration
[ <i>H<sup>+</sup><sub>ex</sub></i> ]:	extrazelluläre H <sup>+</sup> -Ionen-Konzentration
[ <i>lysP</i> ]:	Konzentration der <i>lysP</i> mRNA
[LysP]:	Konzentration LysP

**Tab. 3: Erläuterung der in Tab.1 verwendeten Parameter**

Parameter	Wert	Kommentar
k <sub>1</sub>	10 <sup>-6</sup> nM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	[LysP-CadC] Assoziation
k <sub>2</sub>	10 <sup>-6</sup> nM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	[LysP-CadC] Dissoziation
k <sub>3</sub>	10 <sup>-7</sup> nM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	Aktivierung von CadC durch H <sup>+</sup>
k <sub>4</sub>	1.1 * 10 <sup>-4</sup> nM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	Inaktivierung von CadC durch Cadaverin
k <sub>5</sub>	5 * 10 <sup>-6</sup> nM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	Auflösung von [LysP-CadC] durch Lysin
k <sub>6</sub>	10 <sup>-8</sup> nM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	Aktivierung von [LysP-CadC] durch H <sup>+</sup>
k <sub>7</sub>	0.38 nM/s	v <sub>max</sub> der <i>cadBA</i> -Transkription
k <sub>8</sub>	3 nM	Michaelis Konstante der <i>cadBA</i> -Transkription
k <sub>9</sub>	0.002 s <sup>-1</sup>	<i>cadBA</i> mRNA Degradation
k <sub>10</sub>	0.022 s <sup>-1</sup>	<i>cadA</i> Translation
k <sub>11</sub>	0.0001 s <sup>-1</sup>	CadA Degradation
k <sub>12</sub>	0.04 s <sup>-1</sup>	<i>cadB</i> Translation
k <sub>13</sub>	0.004 s <sup>-1</sup>	CadB Degradation
k <sub>14</sub>	1.3 * 10 <sup>-5</sup> nM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	Lysin Import
k <sub>15</sub>	10 <sup>-5</sup> nM <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	Decarboxylasereaktion
k <sub>16</sub>	10 <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	<i>lysP</i> -Transkription
k <sub>17</sub>	1 nM	Negative Rückkopplung der <i>lysP</i> -Transkription durch Lysin
k <sub>18</sub>	0.0116 s <sup>-1</sup>	<i>lysP</i> mRNA Degradation
k <sub>19</sub>	0.02 s <sup>-1</sup>	<i>lysP</i> Translation
k <sub>20</sub>	0.0116 s <sup>-1</sup>	LysP Degradation
k <sub>21</sub>	5 * 10 <sup>-5</sup> nM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	v <sub>max</sub> CadB
k <sub>22</sub>	3 * 10 <sup>-6</sup> nM <sup>-2</sup>	Michaelis Konstante CadB
k <sub>23</sub>	10 <sup>-6</sup> s <sup>-1</sup>	Zerfall des aktiven CadC
k <sub>24</sub>	10 <sup>-5</sup> s <sup>-1</sup>	Zerfall von [LysP-CadC]

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen meinen Dank aussprechen, die zur Erstellung dieser Arbeit ihren Beitrag geleistet haben:

- ◆ Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Kirsten Jung für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, für die Bereitstellung des überaus interessanten Themas, für ihre sehr gute Betreuung, unermüdliche Unterstützung, ständige Diskussionsbereitschaft und die hervorragenden Arbeitsbedingungen. Außerdem möchte ich ihr danken für die Knüpfung von Kontakten zu anderen Wissenschaftlern und die Möglichkeit, an verschiedenen wissenschaftlichen Tagungen teilzunehmen.
- ◆ Daneben möchte ich auch Prof. Dr. Karlheinz Altendorf und Prof. Dr. Felicitas Pfeiffer für die Aufnahme in ihren Arbeitsgruppen danken
- ◆ Weiterhin möchte ich mich besonders bei Dr. Ralf Heermann, Dr. Arnim Weber und Dr. Torsten Pirch bedanken, dass sie mich bei meiner Deutschland-Tournee begleitet haben, stets wertvolle Tipps und Hilfe parat hatten und für die gute Zusammenarbeit innerhalb und außerhalb der Uni.
- ◆ Außerdem danke ich meinen „Mit-Doktoranden“ Stephanie Kögl, Christiane Koller, Nina Kramer und Tina Odenbach sowie Korinna Burdack und Simone Holpert für stete Hilfsbereitschaft und das tolle Arbeitsklima. Besonderen Dank auch nochmal an Christiane und Torsten für das Korrekturlesen dieser Arbeit.
- ◆ Danke an alle weiteren ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Jung. Alle hier aufzuzählen, würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, stellvertretend seien hier nur Melanie, Iris, Anne, Knut, Claudia, Barbara und Marie genannt. Ohne Euch wäre der Laboralltag nie so angenehm menschlich und lebendig geworden, wie er es während meiner Doktorandenzeit gewesen ist!
- ◆ Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Eduardo Mendoza, Dr. Ulrich Gerland, Akos Dobay und Georg Fritz für die gute Zusammenarbeit bei der Modellierung des Cad-Systems bedanken.
- ◆ Einen herzlichen Dank auch an Dr. Karin Schubert für die Einführung in die HPLC
- ◆ Prof. Dr. Martin Parniske danke ich für die Annahme des Koreferates
- ◆ Zu guter Letzt gilt mein herzlichster Dank meinen Eltern, die mir mein Studium und meine Promotion überhaupt erst ermöglicht haben. Vielen Dank!

## **Lebenslauf**

**Name:** Christoph Küper

**Geburtsdatum:** 21.10.1973

**Geburtsort:** Bielefeld

**Familienstand:** ledig

### **Bildungsgang:**

<b>1980-1984</b>	Grundschule Hasebrink, Meppen
<b>1985-1993</b>	Gymnasium Marianum, Meppen
<b>1993</b>	Abitur
<b>10.1994-07.1995</b>	Studiengang Verfahrenstechnik, Technische Universität Hamburg-Harburg
<b>10.1995-06.2001</b>	Studiengang Diplom-Biologie, Universität Osnabrück
<b>2001</b>	Diplom (Prüfungsfächer: Mikrobiologie, Biochemie und Tierphysiologie)

### **Promotion:**

<b>09.2001-12.2002</b>	Universität Osnabrück Arbeitsgruppe Mikrobiologie Leiter: Professor Dr. K. Altendorff
<b>12.2002-03.2004</b>	TU Darmstadt Arbeitsgruppe Mikrobiologie Leiterin Prof. Dr. K. Jung
<b>03.2004-01.06</b>	LMU München Arbeitsgruppe Mikrobiologie Leiterin Prof. Dr. K. Jung

Die vorliegende Dissertation wurde von Prof. Dr. Kirsten Jung, Institut für Mikrobiologie, LMU München betreut

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe verfaßt und keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe.

München, November, 2005

---

(Christoph Küper)

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, daß ich zuvor noch niemals eine Dissertation eingereicht oder mich einer Doktorprüfung unterzogen habe.

München, November, 2005

---

(Christoph Küper)

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, daß die vorliegende Dissertation noch niemals ganz oder zu wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt wurde.

München, November, 2005

---

(Christoph Küper)